

Resumen

Este Proyecto Fin de Carrera se enmarca dentro de los objetivos generales del proyecto MAT2005-02778 financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia, que lleva por título “*Desarrollo, optimización y procesado de nuevos cementos óseos para cirugía vertebral*” y que se está llevando a cabo en el Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica.

Este Proyecto Fin de Carrera contempla, después de un primer capítulo de revisión bibliográfica, cuatro objetivos o estudios realizados. En el primer estudio se ha evaluado cómo evolucionan las propiedades básicas de fraguado de los cementos de fosfatos de calcio en función de la relación Calcio/Fósforo (Ca/P) de la fase en polvo del cemento. En un segundo estudio (teniendo en cuenta los resultados del primero), el cemento de relación Ca/P=1.50 se modificó con aditivos de hierro y se han estudiado sus propiedades de fraguado y de endurecimiento. En el tercer estudio se ha medido la respuesta de los cementos modificados con hierro a la aplicación de campos magnéticos. Finalmente, se presenta un cuarto estudio que pretende aproximar la respuesta celular o de biocompatibilidad de estos cementos modificados.

Se demostró que la relación Ca/P influye sobre la basicidad de los cementos y su resistencia a la compresión. La relación óptima (Ca/P=1.50) fue utilizada para modificar los cementos óseos con óxido de hierro, nanopartículas de hierro y una solución de nanopartículas de hierro. Mostraron casi todos una resistencia a la compresión mejorada, pero los tiempos de fraguado aumentaron. El óxido de hierro influyó sobre la basicidad de los cementos al aumentarla, lo que no implica complicaciones para el paciente. Desde un punto de vista magnético, las muestras de cemento no respondieron como se esperaba. Los cementos óseos modificados con hierro sólo mostraron comportamiento paramagnético. La biocompatibilidad se analizó y se comprobó que los cementos óseos bioactivos modificados con óxido de hierro no son tóxicos y no tienen un efecto nocivo sobre la proliferación de las células.





Índice

RESUMEN	1
ÍNDICE	3
CAPÍTULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
Resumen.....	7
1.1. Introducción	8
1.2. El concepto de cemento	10
1.3. El concepto de fraguado.....	11
1.3.1. Caracterización del período de fraguado	11
1.3.2. Caracterización mecánica del endurecimiento	13
1.3.3. Caracterización microestructural del endurecimiento	16
1.3.4. Caracterización química del endurecimiento	19
1.4. Factores que afectan a las propiedades del cemento	21
1.5. Conclusión	23
CAPÍTULO 2: EFECTO DE LA RELACIÓN CALCIO/FÓSFORO SOBRE EL FRAGUADO DE CEMENTOS DE FOSFATOS DE CALCIO	25
Resumen.....	25
2.1. Introducción	26
2.2. Materiales y Métodos.....	27
2.2.1. Obtención del cemento	27
2.2.2. Los tiempos de fraguado	27
2.2.3. Endurecimiento del cemento	27
2.2.4. Difracción de Rayos-X	30
2.2.5. Caracterización de la microestructura	30
2.2.6. Medidas de pH	31
2.3. Resultados y discusión.....	32
2.4. Conclusión	38
CAPÍTULO 3: ESTUDIO DEL FRAGUADO DE CEMENTOS DE FOSFATOS DE CALCIO MODIFICADO CON HIERRO	39
Resumen.....	39
3.1. Introducción	40
3.2. Materiales y Métodos.....	41
3.2.1. Los materiales	41
3.2.1.1. La fase de polvo.....	41



3.2.1.2. La fase líquida	41
3.2.2. El molino de bolas.....	42
3.2.3. Preparación de los cementos	43
3.1.3.1. Las cantidades	43
3.1.3.2. Mezclar, rellenar y sacar	43
3.2.4. Cohesión	44
3.2.5. Los tiempos de fraguado	45
3.2.6. Endurecimiento del cemento	45
3.2.7. Caracterización de la microestructura.....	45
3.2.8. Medidas de pH.....	45
3.2.9. Difracción de Rayos-X	46
3.3. Resultados y discusión.....	47
3.4. Conclusión	58

CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE LA RESPUESTA MAGNÉTICA DE CEMENTOS DE FOSFATOS DE CALCIO MODIFICADOS CON HIERRO _____ 59

Resumen	59
4.1. Introducción	60
4.2. Materiales, Métodos y Teoría.....	61
4.2.1. Ciclos de Histéresis	61
4.2.1.1. El ciclo de Histéresis: teoría	61
4.2.1.2. Montaje general.....	62
4.2.1.3. ¿Como funciona la sonda Hall?.....	63
4.2.1.4. Trazar el ciclo de Histéresis y la curva de imantación	64
4.2.2. Permeabilidad magnética relativa (μ_r)	66
4.2.3. Experiencias anexas.....	70
4.2.3.1. Influencia de un campo magnético sobre la temperatura	70
4.2.3.2. Acoplamiento magnético.....	70
4.3. Resultados	71
4.4. Discusión	76
4.5. Conclusión	78
4.5. Conclusión	78

CAPÍTULO 5: ESTUDIO DE BIOCOMPATIBILIDAD DE LOS CEMENTOS DE FOSFATOS DE CALCIO MODIFICADOS CON HIERRO _____ 79

Resumen	79
5.1. Introducción	80
5.2. Materiales y métodos	81



5.2.1. Preparación del cemento	81
5.2.2. Estudio de viabilidad/citotoxicidad	81
5.3. Resultados y Discusión	83
5.4. Conclusiones	87
6. CONCLUSIÓN GENERAL FINAL	89
7. COSTES E IMPACTO MEDIOAMBIENTAL	91
7.1 Costes	91
7.1.1. Los materiales	92
7.1.2. Utilización de las máquinas	92
7.1.3. Recursos humanos	93
7.1.4. Recursos materiales	94
7.1.5. Costes de transportes	94
7.1.6. Coste total	94
7.2. Impacto medioambiental	95
AGRADECIMIENTOS	97
BIBLIOGRAFÍA	99
Artículos	99
Libros	103



Capítulo 1: Revisión Bibliográfica

Resumen

Los cementos de fosfatos de calcio (CFC) son materiales biocompatibles que permiten rellenar una cavidad ósea y que endurecen como un cemento en el lugar de aplicación. Los procesos de fraguado y endurecimiento en estos materiales están controlados por reacciones químicas de disolución y precipitación, a temperatura ambiente o corporal, que implican transformaciones de fases de los compuestos de fosfatos de calcio.

En este capítulo se realiza una revisión bibliográfica de la literatura que tiene interés para este Proyecto Fin de Carrera. La conclusión que se alcanza es que son importantes los estudios cinéticos de los distintos sistemas de fosfatos de calcio ya que permiten acercarse a la situación real de fraguado del cemento implantado. Un mejor conocimiento de la cinética del sistema y una mejor optimización de las propiedades del cemento permitirán obtener CFC con mejores propiedades de fraguado y endurecimiento.



1.1. Introducción

Los cementos óseos bioactivos solo son una parte del mundo fascinante de los biomateriales. Los biomateriales pueden ser definidos como “materiales fabricados por el hombre, que tienen compatibilidad con el cuerpo humano y sus tejidos” como lo dijo el Profesor Larry Hench [1], o como opina el Profesor Jonathan Black, “materiales para suplir o reemplazar los tejidos vivos” [2].

Cuando se habla de biomateriales, la primera cosa en que debemos pensar es la biocompatibilidad. Si un material, cual sean sus propiedades, no tiene compatibilidad con los tejidos, la sangre y/o los huesos, no puede ser inyectado en el cuerpo humano. El riesgo de infección es mucho más grande. El Profesor Black define la biocompatibilidad como “un material que se comporte bien en la aplicación en la que se considere, y que así se puede definir como un biomaterial eficaz”. De este concepto, sacamos una clasificación de los biomateriales:

- ✓ Los inertes
- ✓ Los interactivos
- ✓ Los viables
- ✓ Los transplantables

Los inertes son materiales implantables que no interaccionan químicamente con el tejido vivo que les rodea. Los interactivos son los que tendrán respuestas benéficas como, por ejemplo, la adhesión celular y/o tisular. Los materiales viables incorporan células en el lugar de implantación, y serán tratados como tejidos normales y activamente reabsorbidos por el huésped. Finalmente, los transplantables son biomateriales compuestos de tejidos del paciente cultivados previamente *in vitro* antes de su implantación *in vivo*. Para el Profesor Black, los materiales replantables “representan el éxito de las investigaciones originales de biocompatibilidad, es decir, materiales implantables que demuestran interacciones armoniosas”.

En el pasado la idea era el desplazamiento del tejido, en el presente es reemplazar los tejidos y en el futuro, se tratará de regeneración de tejidos. Considerando el presente, las ventajas de reemplazar tejidos con implantes son la disponibilidad, la reproducibilidad y fiabilidad. Sin embargo, algunos problemas son frecuentemente encontrados, como la estabilidad interfacial del tejido o la fijación del implante. Algunas soluciones parciales han sido propuestas, como fijación morfológica, fijación con cementos, fijación biológica con porosidad. El Profesor Hench propone la fijación bioactiva, es decir un enlace interfacial entre un implante y un tejido a través de una capa



de hidroxiapatita (HA) activa biológicamente en la superficie del implante [1]. En este sentido, materiales que muestren fijación bioactiva son llamados implantes bioactivos. Una definición más general es que un biomaterial es diseñado para modular la actividad biológica. Sin embargo, la palabra “bioactiva” es a menudo relacionada con la presencia de hidroxiapatita, fase mineral parecida al hueso. En este sentido, los cementos óseos bioactivos son materiales cementíticos, con base fosfato cálcico, que a través de reacciones de fraguado forman una red de cristales interconectados de fase mineral similar a la del hueso.



1.2. El concepto de cemento

Los cementos son hechos de un polvo y de un líquido que, al mezclarlos, forman una pasta que fragua con el tiempo para dar un cuerpo sólido. Los cementos óseos bioactivos son hechos de una mezcla de fosfatos cálcicos y de una solución acuosa. Las propiedades físicas, químicas o mecánicas $P(x_i, t)$ que caracterizan el fraguado de estos materiales pueden ser aproximadas con funciones matemáticas $f(x_i, t)$, y dependen de los factores experimentales y del tiempo (Ecuación 1).

$$P(x_i, t) \equiv f(x_i, t) \quad (1)$$

Este proceso ha sido utilizado para el diseño y el desarrollo de nuevos cementos óseos bioactivos [3].

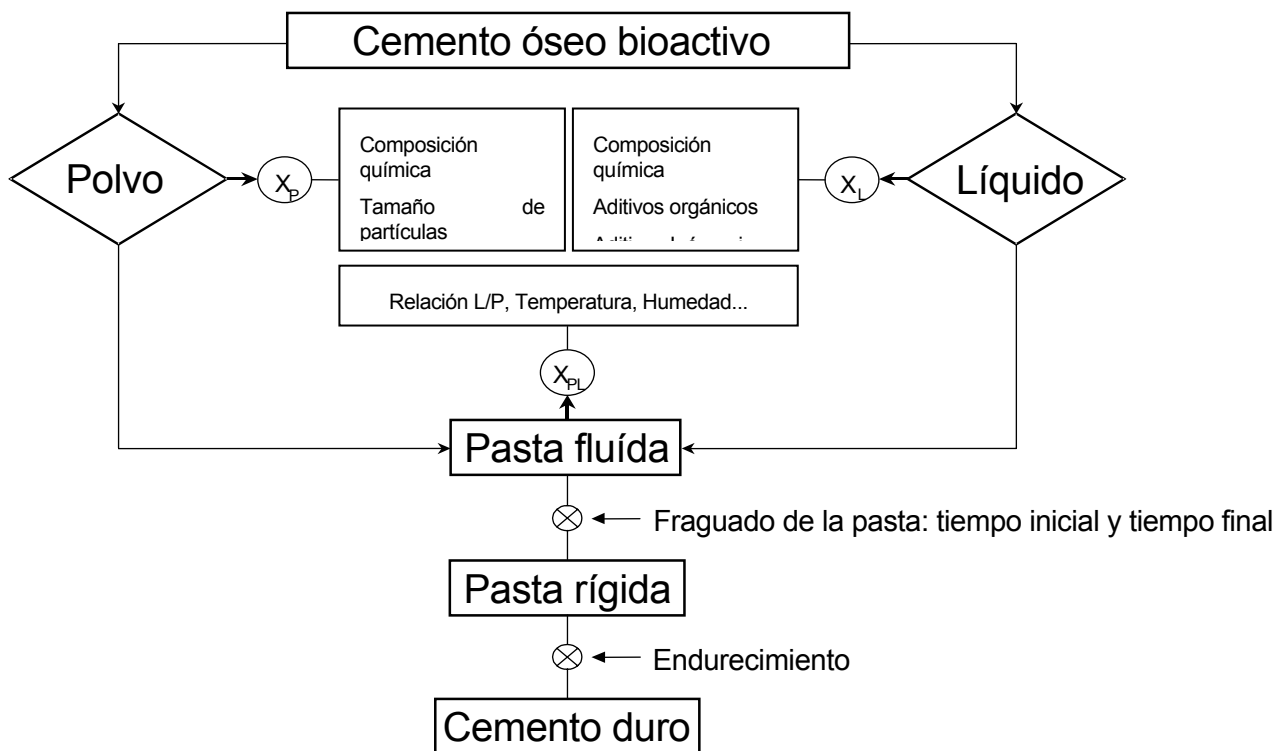


Figura 1. Diagrama de la tecnología de cementos óseos [de ref.33].



1.3. El concepto de fraguado

El fraguado de cementos óseos bioactivos es un proceso continuo que implica dos reacciones químicas conocidas: disolución y precipitación. Durante este proceso nuevos cristales son formados. Con el tiempo, estos cristales crecen y se enredan, así que el cemento pierde sus propiedades viscosas para endurecerse [4].

Este proceso se llama fraguado del cemento. Sin embargo, hay que distinguir el fraguado y el endurecimiento del cemento. El fraguado es el período en el que del polvo y de la solución acuosa se pierden las propiedades de viscosidad, mientras que el endurecimiento es el período entre el fraguado y la transformación total del cemento sólido, sin reacciones químicas añadidas.

1.3.1. Caracterización del período de fraguado

Las propiedades principales que son medidas para caracterizar el tiempo de fraguado son el tiempo de cohesión, el tiempo inicial de fraguado (TIF) y el tiempo final de fraguado (TFF).

El tiempo de cohesión es el tiempo que se necesita, después de la mezcla del polvo y del líquido en una pasta homogénea, para que el cemento no se desintegre al ponerlo en contacto con fases líquidas, como agua, solución de Ringer y/o sangre (ver figura 2) [5].

El tiempo inicial de fraguado, que marca el inicio del fraguado, es el tiempo máximo que tiene el cirujano para implantar la pasta homogénea en el cuerpo del paciente sin que sea afectada su microestructura, y finalmente sus propiedades después del endurecimiento [6].

El tiempo final de fraguado, de forma similar, marca el final del fraguado y el principio del período de endurecimiento. Es el tiempo máximo que tiene que esperar el cirujano antes de cerrar la herida sin que las propiedades y estabilidad mecánicas del cemento sean afectadas [6].

Estas definiciones son utilizadas experimentalmente para optimizar las investigaciones sobre los cementos óseos, y su comercialización. En este sentido, los científicos buscan un tiempo de cohesión cerca de 0, o por lo menos muy inferiores al tiempo inicial de fraguado [7]. Sinó, estos cementos pueden desintegrarse en contacto con los fluidos del cuerpo humano. Los valores óptimos para los tiempos iniciales de fraguado y los tiempos finales de fraguado son $4 < \text{TIF}(\text{min}) < 8$ and $10 < \text{TFF}(\text{min}) < 15$ [6].



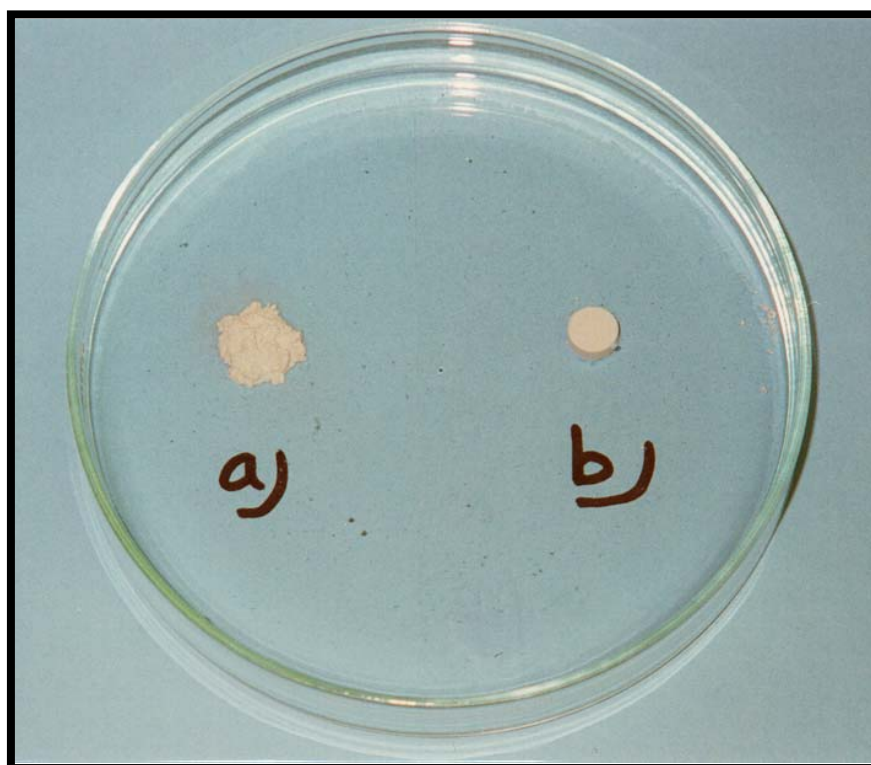


Figura 2. Ejemplo de ensayo de cohesión : a) el cemento se desintegra al ponerle en contacto con agua; b) el cemento tiene cohesión y guarda su forma inicial [de ref.33].

Para medir los tiempos de fraguado de nuestros cementos de base cerámica, existe un método particular por falta de normas adecuadas. En los cementos de base poliméricos, medir los tiempos de fraguado es bastante sencillo teniendo en cuenta que estos tienen una exotermia de polimerización. Así se puede monitorizar la evolución de la temperatura durante el proceso de fraguado y conocer precisamente los tiempos iniciales y finales de nuestro proceso de curado. Los cementos de base cerámica, porque tienen una exotermia pequeña, no se comportan como los cementos base polimérico y las normas son diferentes. Las normas utilizadas son los estándares ASTM C191-92 (agujas Vicat) [8] y la ASTM C266-89 (agujas Gillmore) [9] (ver figura 3).

En este proyecto, se utilizó el método Gillmore. La idea de este método es examinar a distintos tiempos la huella dejada por unas agujas que ejercen una cierta presión sobre una superficie plana del cemento. El método Gillmore se descompone en dos partes: la medida del tiempo inicial de fraguado (TIF) y la medida del tiempo final de fraguado (TFF). El tiempo inicial de fraguado se mide con una aguja que ejerce una presión estática equivalente a 0.3 MPa. Para saber el tiempo final, la presión ejercida cambia y tiene como valor 5 MPa. Cuando aplicamos la aguja y ésta no deja huella sobre la superficie, se puede decir que el tiempo correspondiente (inicial o final) ha sido alcanzado.



Este método ha sido utilizado desde el descubrimiento de los fosfatos de calcio. Sin embargo, son muy criticados, al ser bastante subjetivos porque se trata de una inspección visual. Además, el cemento debe ser inyectado en el paciente muy antes del tiempo inicial de fraguado, sinó es imposible realizarlo. Los investigadores presentan la inyectabilidad del cemento como el problema principal de resolver hoy en día en la «Cirugía de Mínima Invasión» (CMI) [3].

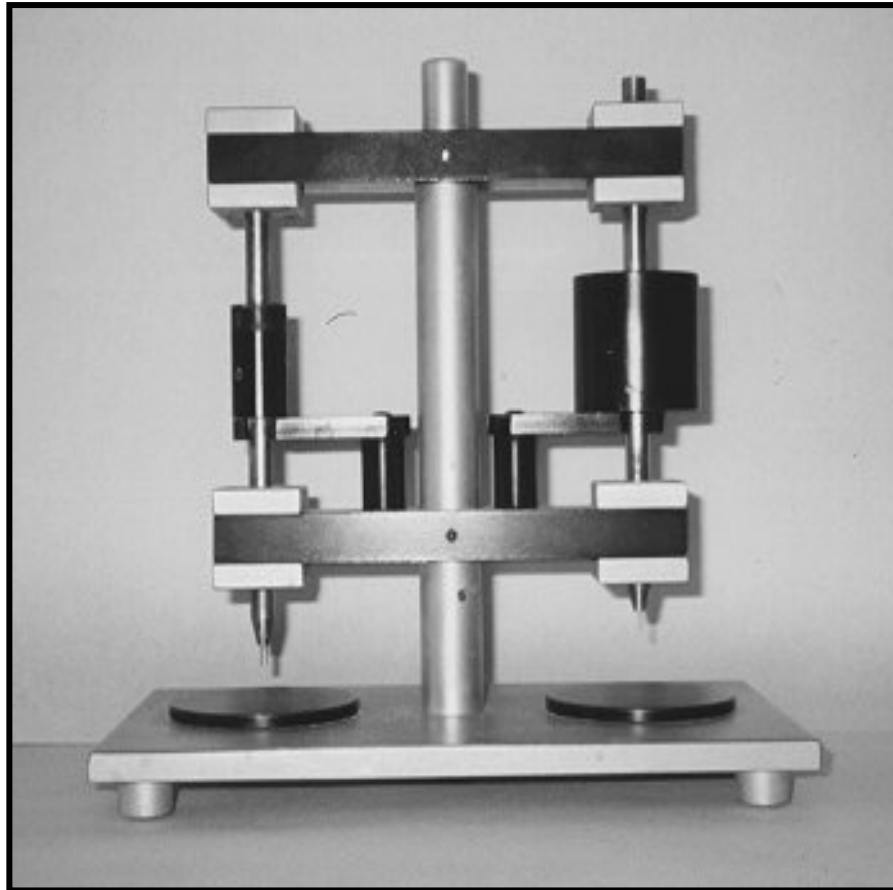


Figura 3. Agujas Gillmore segun la norma estándar ASTM C266-89. La pequeña aguja a la izquierda mide el TIF, mientras que la aguja a la derecha mide el TFF [de ref.33].

1.3.2. Caracterización mecánica del endurecimiento

El endurecimiento, transición del estado viscoso de nuestra pasta hasta el estado sólido, es caracterizado midiendo algunos parámetros mecánicos. Normalmente se miden la resistencia a compresión $C(x_i, t)$ o la tensión diametral $D(x_i, t)$ [10]. En este proyecto se midió la resistencia a compresión. Básicamente, pequeñas probetas cilíndricas son fabricadas a partir de moldes de teflón o acero inoxidable. Después fraguan, para tiempos fijos, en condiciones *in vivo*, es decir a 37°C y 100% de humedad, en una solución



acuosa (agua, solución Ringer, sangre...). Luego estas probetas se ensayan a compresión con una máquina electromecánica, normalmente a una velocidad de 1 mm/min, y se registra la compresión máxima antes de la rotura [11] (ver figura 4).



Figura 4. Las muestras de cemento son ensayadas con una máquina de compresión. La resistencia máxima a compresión es recordada frente al tiempo [de ref.33].

La procedura óptima para caracterizar el endurecimiento de cementos óseos es trazar la curva de resistencia a la compresión $C(x_i, t)$ en función del tiempo, a partir del tiempo final de fraguado hasta la saturación (la resistencia a compresión alcanza un valor constante) [11,12,13,14] (ver figura 5). De esta manera, tenemos informaciones sobre los mecanismos físicoquímicos implicados durante este período de endurecimiento. Estas informaciones son en general confirmadas con Microscopia Electrónica de Barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM) y Difracción de Rayos-X (X-ray Diffraction, XRD) [12,13,14].



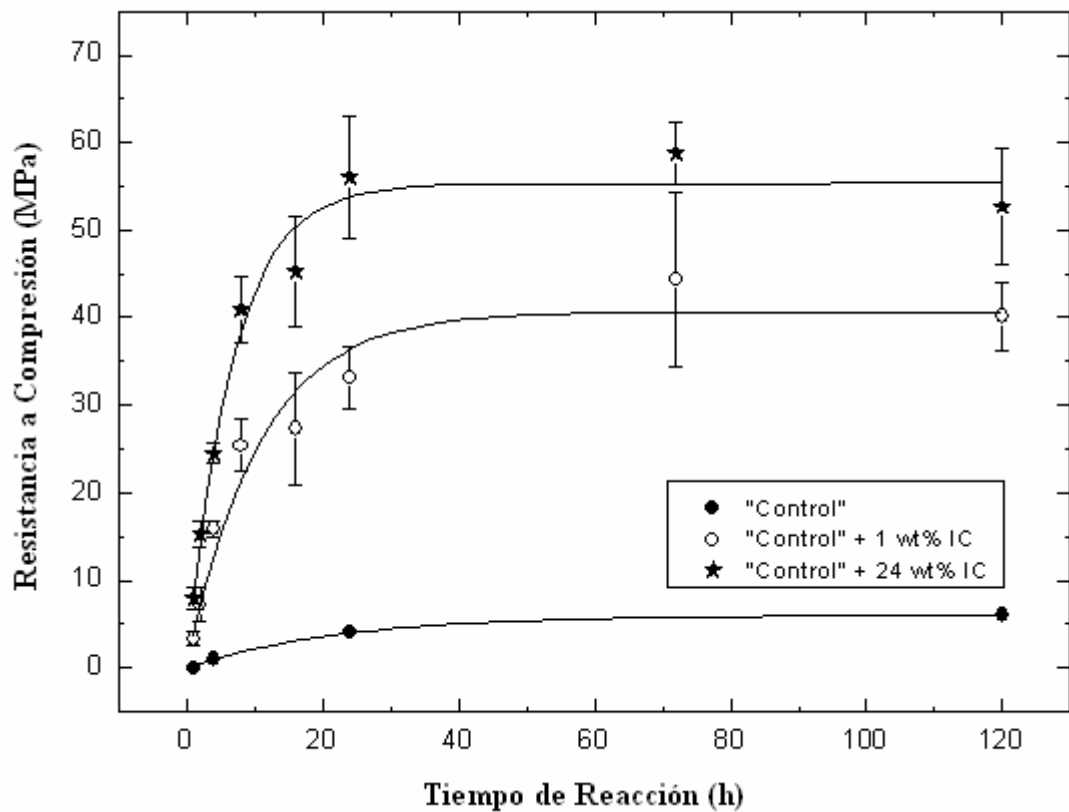


Figura 5. Curvas de resistencia a la compresión de un cemento óseo bioactivo modificado con citrato de hierro. [de ref. 15]

Además, es la única manera de comparar dos cementos entre sí (para cementos fabricados con factores experimentales x_i) y de estudiar seriamente la influencia de estos factores experimentales x_i sobre las propiedades mecánicas. Así, algunos autores han modelizado la curva de endurecimiento con la ecuación 2 siguiente [12,13,14,15] :

$$C(x_i, t) = C_0(x_i) \cdot [1 - \exp(-\frac{t}{\tau_c(x_i)})] \quad (2)$$

Las informaciones obtenidas a partir de la constante de tiempo T_c , que es función de los factores experimentales x_i , liga el desarrollo de la microestructura de la red cristalina que es responsable de la resistencia mecánica a la reactividad química de las fases del polvo del cemento [12,13,14,15]. Esta aproximación da valor a la existencia de estudios cinéticos frente a estudios termodinámicos.

Sin embargo, desde la descubierta de los cementos óseos bioactivos, los investigadores sólo han registrado la resistencia a compresión para un tiempo de 24 horas, es decir el tiempo característico de los cementos dentales [16]. La consecuencia



es que no se conoce el comportamiento mecánico del cemento después de este umbral. Es por eso que se puede encontrar en artículos algunas contradicciones entre autores, sobre los valores de resistencia a compresión, que son sin embargo todos adecuados para sus aplicaciones. De toda forma, las experiencias han mostrado que los cementos óseos bioactivos deben ser aplicados para cargas bajas, que correspondan a la resistencia del hueso trabecular (10-30 MPa). Los últimos estudios se han dirigidos hacia los problemas de inyectabilidad [3,17], de estabilidad y de transformación en tejido óseo *in vivo* [18].

1.3.3. Caracterización microestructural del endurecimiento

Los cementos óseos bioactivos son hechos para aplicaciones como el relleno del hueso. Una parte importante en la investigación sobre los cementos óseos es la osteointegración (unión estructural y funcional entre el hueso y el implante) y las otras transformaciones del implante en tejido óseo. Algunos autores han utilizado el concepto de cementos óseos osteotransductivos para explicar que estos materiales (cristales parecidos a apatita químicamente enredados) sean reabsorbidos y reemplazados por tejido óseo sin pérdida de estabilidad mecánica durante la transformación [19]. Desde el descubrimiento de los cementos óseos, los investigadores han seguido, con la ayuda de Microscopia Electrónica de Barrido, la evolución de esta microestructura durante el endurecimiento del cemento como una función de los factores experimentales y del tiempo. Evidentemente, éste no ha sido medido sino observado visualmente y registrado (ver figura 6). Así, ha sido posible observar cómo cambia la microestructura de un cemento, añadiendo por ejemplo, pequeñas cantidades de ácido cítrico [15], de polímeros [20], o cómo se desarrolla la porosidad en el cemento [13,20,21] (ver figura 7). Lo más interesante es que estos estudios han permitido explicar la estabilidad mecánica a corto o largo tiempo, durante el fraguado. Los procesos de disolución, nucleación, precipitación, de crecimiento y de entrecruzamiento han sido perfectamente reportados [15,20] (ver figura 8). Esta información también sirve para mostrar la importancia de los estudios cinéticos frente a los estudios termodinámicos en los fosfatos de calcio.



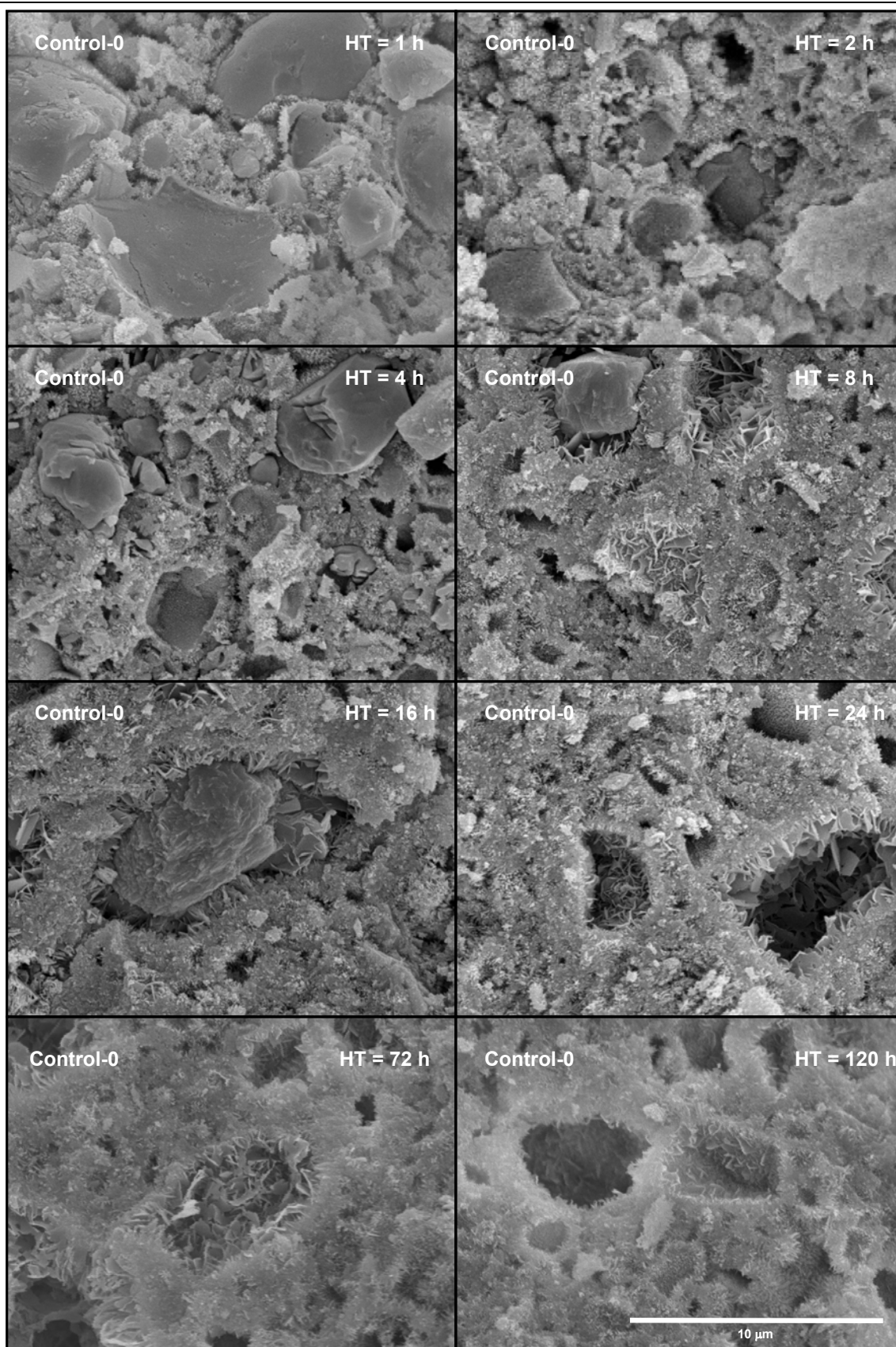


Figura 6. Fotos de Microscopia Electrónica de Barrido, tomadas a diferentes tiempos, mostrando la evolución de la microestructura de un cemento óseo bioactivo. [de Ref. 13].



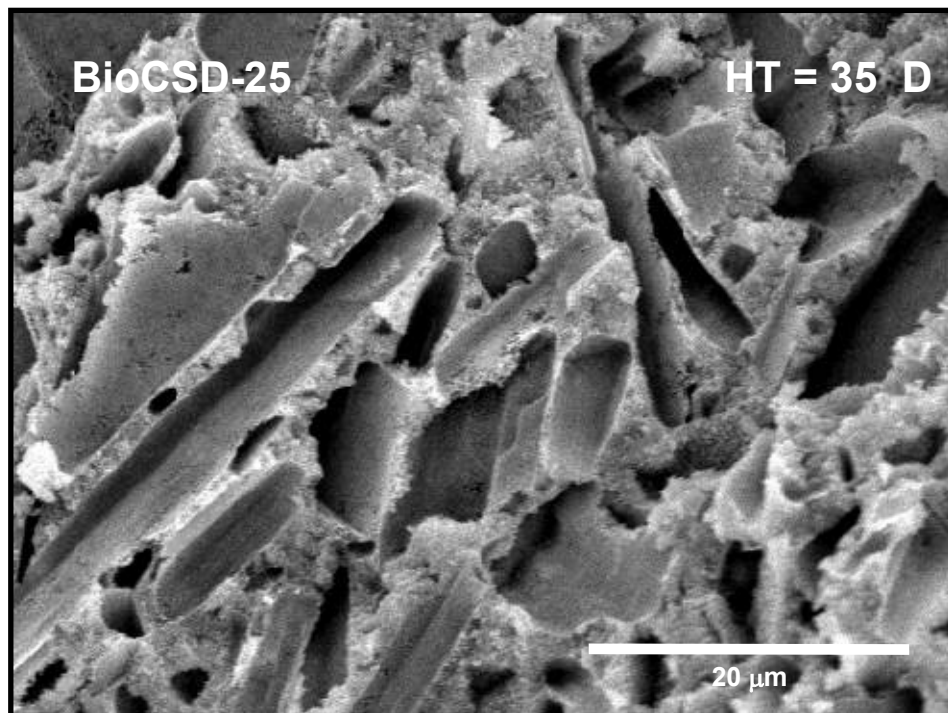


Figura 7. Este cemento óseo bioactivo, llamado BioCSD-25, desarrolló macroporosidad después de 35 días de fraguado cuando se modificó con cristales de sulfato de dihidrato [de Ref. 13].



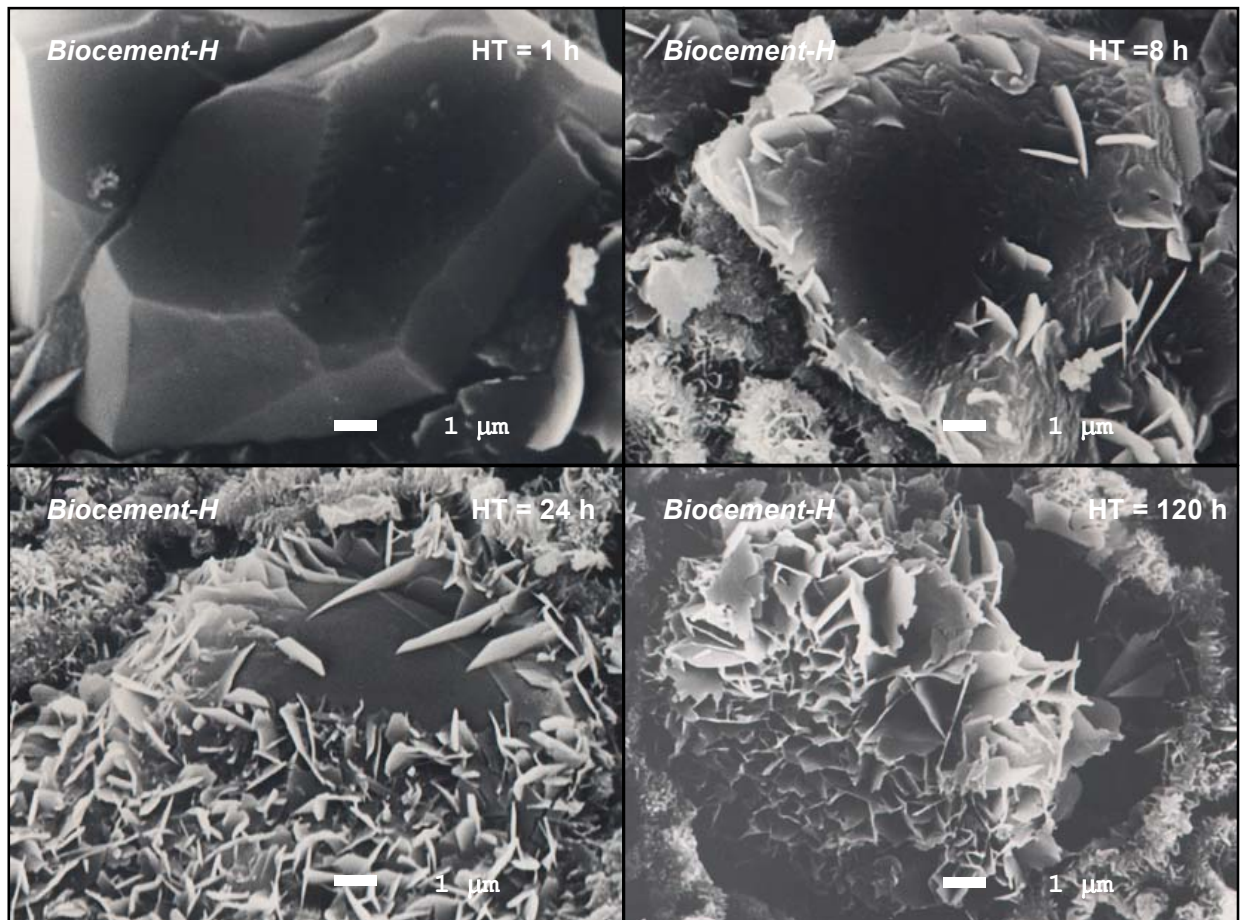


Figura 8. Fotos de Microscopia Electrónica de Barrido mostrando diferentes etapas del fraguado del Biocement-H® (arriba a la izquierda: disolución de partículas de α -fosfato tricálcico después de 1 h de fraguado ; arriba a la derecha: nucleación y crecimiento de cristales de apatita después de 8 horas; abajo a la izquierda: crecimiento en superficie después de 24h; abajo a la derecha, crecimiento en difusión después de 120 horas [de 20].

1.3.4. Caracterización química del endurecimiento

La química (termodinámica) de los cementos de fosfato de calcio es conocida y es una base para el desarrollo del material. Hay muchos artículos donde se explican las partes principales de la química de un cemento [22,23]. En particular, los conceptos como isoterma de solubilidad, puntos singulares, solución sobresaturada, disolución y precipitación han sido analizados en detalle. Sin embargo, la evolución actual de la química de cementos siempre ha sido seguida por difracción de rayos-X [4,12,13,15]. Algunos autores han seguido la evolución de la resistencia a compresión y de las fases químicas que desaparecen (disolución de las fases de polvo del cemento) o aparecen (precipitación de nuevas fases cristalinas) durante los procesos de fraguado y de endurecimiento. El coeficiente de reacción química, R , que depende de los factores



experimentales x_i y del tiempo, ha sido calculado para el proceso de disolución y el proceso de precipitación, según la ecuación siguiente:

$$R(x_i, t) = R_0(x_i) \cdot [1 - \exp(-\frac{t}{\tau_r(x_i)})] \quad (3)$$

Esta ecuación se comparó con la ecuación de la curva de endurecimiento (ecuación (2)), y se sacó resultados y conclusiones interesantes [12,13,15].

Por ejemplo, es claro que a través de los valores de $T_C(x_i)$ y $T_r(x_i)$, el endurecimiento del cemento y el coeficiente de reacción son directamente relacionados, es decir que ambos son medidas de mismos procesos correlacionados (disolución, nucleación, precipitación, crecimiento y entrecruzamiento de cristales parecidos a apatita) [12,13,15]. También se observó que la disolución del reactivo principal del polvo del cemento, estimado por XRD gracias a la constante de tiempo $T^d_r(x_i)$, es directamente seguida de precipitación de una fase apatítica, es decir que $T^p_r(x_i) \geq T^d_r(x_i)$. Esto nos indica que un cierto grado de disolución debe ocurrir antes de que haya precipitación, que agradezca el hecho de que se necesita un cierto grado de precipitación antes de poder medir la resistencia a compresión, es decir $T_C(x_i) \geq T^p_r(x_i)$ [12,13,15]. Otro análisis, más complejo, permitió entender, con la ayuda de observaciones de microestructura con SEM, cuándo las reacciones químicas son controladas por la superficie disponible para la disolución del reactivo de polvo del cemento, o por difusión a través de una envoltura (cáscara) de cristales de apatita precipitados, que rodean las partículas principales [15] (ver figura 9).

En general, estos estudios, han marcado la relevancia de la cinética frente a la aproximación termodinámica del fraguado de un cemento óseo bioactivo (base fosfato de calcio). Además, como las propiedades del cemento pueden ser moduladas, al seleccionar los factores experimentales x_i adecuadamente, el diseño experimental de los cementos óseos bioactivos puede ser cambiado. La parte siguiente trata de estos factores experimentales.



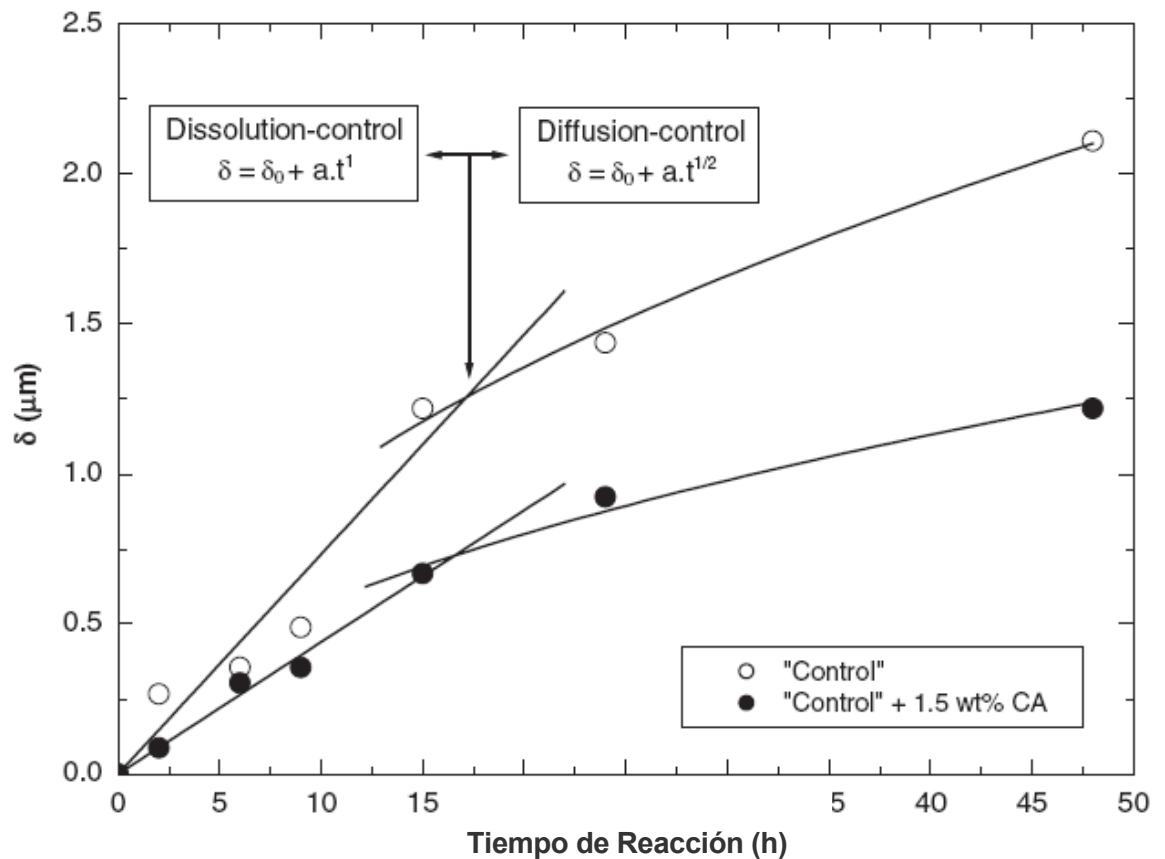


Figura 9. Cemento óseo bioactivo modificado con ácido cítrico. Algunos modelos determinan cuando el fraguado ha sido controlado por difusión o por disolución. [de ref.15].

1.4. Factores que afectan a las propiedades del cemento

La ecuación 1 da por cierto que una propiedad de cemento medible (para un tiempo t) es una función compleja de algunos parámetros experimentales x_i , que sean controlados o no. Los factores principales que afectan a la fase polvo (y así las propiedades finales del cemento) son:

- ✓ La naturaleza química de los reactivos [23]
- ✓ Las proporciones de estos reactivos [7,11,23]
- ✓ El tamaño de partícula de los reactivos [17]
- ✓ La presencia de aditivos (acelerantes, retardantes, fluidificantes...) [17]



De manera similar, el factor principal que afecta a la fase líquida es su pureza, debida a la presencia de algunos aditivos.

El factor principal que afecta a la mezcla es la relación entre líquido y polvo L/P. Esta actúa sobre los tiempos de fraguado y sobre la reología del cemento [17,24]. Otros factores son la temperatura (cuanto más grande es la temperatura, más rápidamente fragua el cemento) y la humedad [25,26].

La optimización de un cemento, como se puede comprobar, es muy compleja. Por ejemplo, un cemento óseo “ideal” debería tener:

- ✓ Un tiempo de cohesión nulo
- ✓ Tiempos de fraguados cortos
- ✓ Resistencia a la compresión máxima
- ✓ Buena inyectabilidad
- ✓ Facultad de desarrollar porosidad

Sin embargo, la experiencia muestra que tener todos estos factores juntos es, de momento, casi imposible. Un ejemplo es que para obtener tiempos de fraguados cortos y una buena resistencia mecánica, es importante tener reactivos con un pequeño tamaño de partículas. Una alta superficie permite una reactividad química más grande (disolución más rápida, supersaturación alcanzada más temprana, como la precipitación). Pero, si la relación L/P es mantenida constante, la cohesión aumenta a menudo [7]. Si la superficie es ampliada, más líquido será adsorbido por las partículas y así la pasta del cemento estará más densa. Esto muestra una buena resistencia a saturación, pero el cemento no se podrá inyectar [3,7].

Este ejemplo nos permite ver las interacciones entre los factores experimentales x_i , que pueden favorecer algunas propiedades (tiempos de fraguado, resistencia mecánica) frente a otras (inyectabilidad, porosidad). Finalmente, es imprescindible tener en cuenta la opinión del principal interesado, el cirujano, como punto de partida de cada estudio sobre cementos óseos bioactivos. Hoy en día, las investigaciones se enfocan más en los temas de inyectabilidad [3,7,27].



1.5. Conclusión

En este capítulo, los cementos óseos bioactivos son materiales hechos exclusivamente con materiales bioactivos, es decir, los fosfatos de calcio. Sin embargo, el Prof. Oonishi [28] propuso tres tipos de cementos óseos bioactivos:

- ✓ Los fosfatos de calcio, material bioactivo
- ✓ Los cementos óseos bioactivos en superficie, como por ejemplo la adición de una partícula bioactiva a una matriz no bioactiva
- ✓ Los cementos óseos bioactivos en interfases, donde un material bioactivo es colocado entre el hueso y el cemento no bioactivo (polimérico), es decir granulados de hidroxiapatita

El mundo de los cementos óseos bioactivos es muy complejo, donde siempre se deben hacer compromisos. Los factores experimentales, para la preparación de un cemento, son esenciales a la finalidad del producto que inyectará en el paciente el cirujano. Las investigaciones sobre el tema de cementos óseos bioactivos tienen mucho futuro, como lo confirman cada año los múltiples artículos publicados por los especialistas.



Capítulo 2: Efecto de la relación Calcio/Fósforo sobre el fraguado de cementos de fosfatos de calcio

Resumen

Los cementos óseos activos de fosfato de calcio tienen propiedades complejas que se correlacionan todas entre sí. Así que siempre se debe hacer compromisos entre estas propiedades para favorecer una sobre otra.

Este capítulo tiene como objetivo el estudio de la relación Calcio/Fósforo sobre el fraguado de cementos óseos de fosfatos de calcio. Se estudiará si, al cambiar la estequiometría de la reacción de sinterización de los fosfatos de calcio, es decir, la relación Ca/P del polvo inicial del cemento, las propiedades principales del cemento se ven influenciadas.

En nuestro caso se ensayaron probetas con diferentes relaciones Ca/P a compresión para comprobar las propiedades mecánicas del cemento, y después se hizo un estudio del pH, también en función de Ca/P. Estos estudios han sido comprobados con difracción de rayos-X.

Se demostró que la resistencia a la compresión tiene un óptimo para una relación Ca/P~1.50 y que el pH influencia la basicidad de los cementos, que aumenta cuando Ca/P aumenta. La difracción de rayos-X reveló los diferentes compuestos del cemento, y se sacó que los compuestos cambian, en relación con el diagrama de fases, lo que tiene como consecuencias variaciones de la microestructura y de la resistencia a la compresión.



2.1. Introducción

El $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ($\alpha\text{-TCP}$) es el componente básico de la fase sólida en el caso de algunos cementos bioactivos de fosfato de calcio.

Los fosfatos de calcio (FC), especialmente hidroxiapatita, han generado un grande interés relacionado con las aplicaciones en tejido óseo, debido a su bioactividad (capacidad de formar enlaces químicos con el tejido adyacente). Las cerámicas de fosfato de calcio, tales como hidroxiapatita o $\alpha\text{-TCP}$ son utilizadas en aplicaciones que suponen el relleno de cavidades y actúa a través de la aposición de tejido sobre el implante. Desde el punto de vista cristalográfico, la hidroxiapatita es más similar a la apatita tisular ósea que $\beta\text{-TCP}$, y por esto representa un material estructural mejor para el crecimiento óseo. Sin embargo, la tasa de reabsorción de la hidroxiapatita es extremadamente lenta por comparación con $\beta\text{-TCP}$. La solubilidad de otros fosfatos de calcio cerámicos es más grande que la tasa de regeneración de tejido óseo y por lo tanto no son útiles en este tipo de aplicaciones.

La principal ventaja de los cementos de fosfato de calcio, desde el punto de vista clínico, es la posibilidad de aplicación a través de métodos de mínima invasión. Las propiedades de fraguado y endurecimiento de un cemento de fosfato de calcio son controladas por los procesos de disolución y precipitación. La química de los cemento de fosfato de calcio originó sus diferentes formulaciones investigadas hasta hoy.

Este estudio fue enfocado en la evaluación de las propiedades de los cementos preparados a base de fosfatos de calcio obtenidos por sinterización y poseyendo una relación Calcio/Fósforo (Ca/P) distinta, teniendo en cuenta el hecho de que la relación Ca/P influye sobre de la basicidad de estas sales, con consecuencia directa sobre las propiedades mecánicas finales de estos cementos.



2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Obtención del cemento

La fase sólida del cemento fue obtenida a través de un proceso de sinterización a 1400°C de una mezcla de fosfato de calcio (CaHPO_4 ; Sigma, Ref. C-7263) y carbonato calcico (CaCO_3 ; Sigma, Ref. C-4830) a una relación Calcio/Fósforo de 1.29, 1.50, 1.51, 1.58, 1.67 y 1.77 respectivamente.

Los fosfatos de calcio obtenidos fueron molidos utilizando un molino de bolas, de ágata, para obtener un tamaño de partículas adecuado, de aproximadamente 7,4 μm .

La pasta del cemento se preparó a una relación Líquido/Polvo de 0.32 mL/g, mezclando la fase sólida en polvo con una solución acuosa que contenía 2.5% en peso de fosfato de sodio (Na_2HPO_4 ; Panreac-131679) como acelerante. Se han utilizado como semillas cristales de hidroxiapatita (PHA; Merck-2143), 2% en peso, añadidas en la sólida.

2.2.2. Los tiempos de fraguado

Los tiempos de fraguado, inicial y final, se han medido con las agujas Gillmore (ver 1.3.1). La pasta del cemento fue moldeada para obtener muestras cilíndricas ($\varnothing=5\text{mm}$, $h=10\text{mm}$) que se han mantenido en inmersión a 37°C, en solución de Ringer (solución acuosa 0.9% en peso NaCl).

2.2.3. Endurecimiento del cemento

Para caracterizar el endurecimiento de los cementos, se hicieron ensayos de compresión con una máquina electromecánica MTS-Insight-5 (ver figura 10 y 11). Esta máquina, conectada con el programma TestWorks 4.0 nos permite ensayar las muestras adecuadamente. La máquina es bastante sencilla de utilizar.





Figura 10. La máquina de compresión

Sólo hay que encenderla, lanzar el programma TestWorks 4.0 y abrir el programa “compresion_muestra2”. Una vez este hecho, hay que calibrar la máquina, es decir verificar la distancia entre la parte superior y la parte inferior. Esta distancia es de 11.2 mm. Nuestras muestras son cilíndricas y hay que entrar estos datos también. Tienen la geometría del molde de acero inoxidable del cual han sido sacadas ($\varnothing=5\text{mm}$, $h=10\text{mm}$).



Figura 11. El ensayo de una probeta

La distancia de 11.2 mm es necesaria para poder poner la muestra de cemento a ensayar, y que el ensayo no sea “brutal”. Se pone la carga a 0 N y se puede empezar a comprimir el cilindro de cemento. Las probetas se ensayaron a una velocidad de avance



de 1 mm por minuto (ver 1.3.2). Es una velocidad pequeña pero para nuestra geometría es suficiente para que no tarde mucho el ensayo, y que no destruya la muestra al ir muy rápido.

El programa nos permite seguir la carga (en Newton) de la probeta en función de la deformación (en %). Al principio del ensayo la curva no es recta. Esto es debido al ruido, que tenemos hasta que la parte superior toque a la muestra. Este ruido se borra después para tener una curva sana. El programa nos da, para cada probeta, las informaciones siguientes: la carga máxima (N), la tensión máxima (MPa) y el módulo de Young. Al final tenemos la media y la desviación estándar de los tres factores citados antes (ver figura 12).

Se ensayaron probetas con relaciones Calcio/Fósforo diferentes, para tiempos de fraguado de 4 y 24 horas. Se graficaron las medidas de resistencia a compresión en función de la relación Calcio/Fósforo.

El valor de la resistencia a la compresión (MPa) obtenido en cada ensayo es un promedio de 8 valores, correspondientes a las muestras analizadas para los tiempos de reacción establecidos previamente.



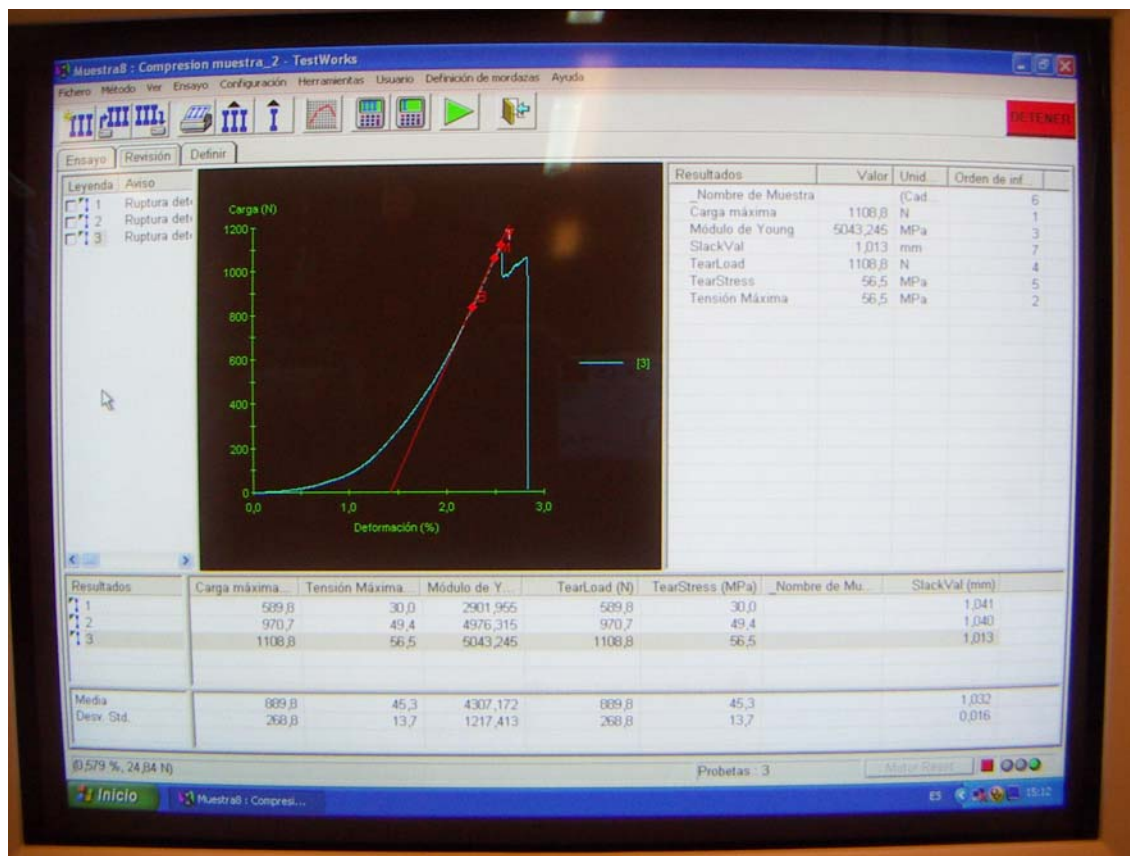


Figura 12. Pantalla del ordenador con los datos y la curva carga (N) en función de la deformación (%)

2.2.4. Difracción de Rayos-X

La reacción de fraguado del cemento fue bloqueada después de 4 y 24 horas para cada formulación (manteniendo las muestras en acetona durante 1 hora) y las muestras secas fueron molidas y caracterizadas, de punto de vista de la composición de las fases, mediante la difracción de rayos X (XRD; Siemens-D500).

2.2.5. Caracterización de la microestructura

La evolución de la microestructura de las muestras se analizó, para diferentes tiempos de endurecimiento, con Microscopía Electrónica de Barrido (SEM; JEOL JSM 6400), en la superficie de muestras fracturadas longitudinalmente. Se eligió las muestras que presentaban la superficie más “plana”. Los cementos son eléctricamente aislantes, así que antes de ser observadas, las muestras han sido recubiertas de una fina capa de oro que aumenta la conductividad eléctrica de la muestra y mejora las características de la imagen.



2.2.6. Medidas de pH

Las medidas de pH se tomaron con un pHmetro universal (S40-KS Mettler-Toledo). Se puso en un bote una solución acuosa de 2.5% en peso de hidrógeno-fosfato de sodio Na_2HPO_4 , a la cual se añadió 1g del polvo a medir, en este caso cementos con relaciones Calcio/Fósforo diferentes. Se tomaron las medidas de pH cada minuto, durante un tiempo de 1400 minutos. Las medidas de pH se graficaron después, para cada polvo, en función de este tiempo.



2.3. Resultados y discusión

La figura 13 muestra la evolución de la resistencia a la compresión en función de la relación Calcio/Fósforo que tenemos en el cemento. Esta curva ha sido aproximada con una distribución en campana de Gauss. La resistencia a la compresión ha sido registrada para dos tiempos de endurecimiento diferentes: 4 h y 24 h.

La primera observación que se puede hacer es al nivel de la relación Calcio/Fósforo. Se nota que la resistencia a la compresión es máxima para un cierto valor cerca de 1.5. Los valores de resistencia a la compresión bajan, tanto para una relación Ca/P más alta como más baja. El endurecimiento de cementos de α -TCP es debido a la nucleación, precipitación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita deficiente en calcio. Vemos que para un tiempo de endurecimiento mayor, los cristales de hidroxiapatita, al tener más tiempo para precipitar y entrecruzarse, aumentan el valor de resistencia a la compresión.

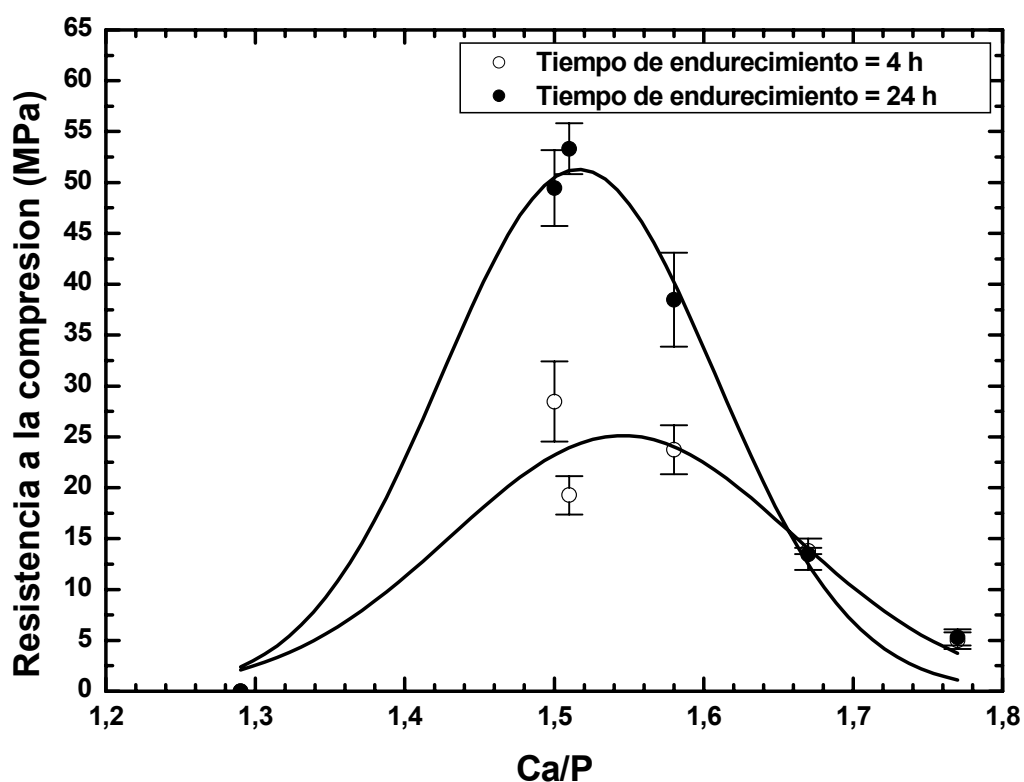


Figura 13. Evolución de la resistencia a la compresión en función de la relación Calcio / Fósforo



La figura 14 siguiente muestra la evolución del pH de los reactivos en polvo sinterizados con las distintas relaciones Calcio/Fósforo de estudio, en función del tiempo. Se nota que al principio, los pHs son muy parecidos y aproximadamente de 9. Cuando la disolución empieza, los valores de pH aumentan, excepto para la curva de $\text{Ca/P}=1.29$ que baja, en función de sus relaciones Calcio/Fósforo. Cuanto mayor es el valor de la relación Ca/P , más grande es el valor del pH, es decir, que los reactivos de sinterización son más básicos. Esta tendencia favorece el resultado que se ha visto anteriormente, sobre la existencia de un máximo en la curva de endurecimiento (ver Figura 13) ya que el grado de sobresaturación de la solución (que es quien controla la velocidad de precipitación) respecto de la isoterma de solubilidad de la hidroxiapatita también tiene un máximo en el intervalo de pH cercano a 9, es decir, que coincide con el valor observado para la relación $\text{Ca/P}=1.50$ [22].

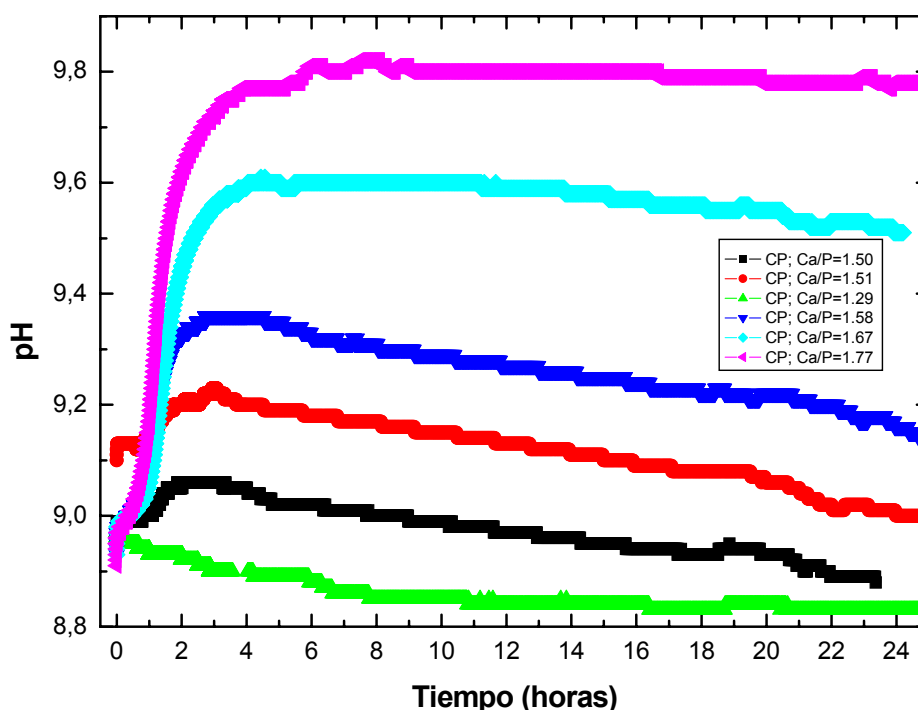


Figura 14. Evolución del pH en función del tiempo (minutos)

La figura 15 muestra el diagrama de fases del sistema binario $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ en ausencia de agua. Podemos ver que el fosfato tricálcico se puede obtener a través de reacciones de estado sólido. Se presenta en dos formas cristalográficas distintas, en función de la temperatura: la fase α , estable por encima de los 1180°C tiene una estructura monoclinica, mientras que la fase β , estable por debajo de 1180°C tiene una estructura hexagonal. Al ajustar la relación Ca/P de la mezcla a sinterizar, se consigue cambiar el porcentaje en peso relativo de las distintas fases (fosfatos de calcio) estables a la temperatura de temple, según



precipitación de hidroxiapatita hasta el equilibrio [23]. Cuanto más básico es el compuesto, más retrasada será la precipitación de hidroxiapatita ya que en este caso, el grado de sobresaturación de la solución disminuye y la tendencia cinética de la precipitación también. Hemos visto que al aumentar la relación Calcio/Fósforo, aumenta el valor del pH y estará básico. Entonces, los compuestos que tienen un pH básico verán la precipitación de hidroxiapatita retrasada, y entonces la resistencia a la compresión será más baja inicialmente, como podemos comprobar en la curva de endurecimiento (ver Figura 13). En cuanto a los tiempos de endurecimiento, la precipitación será mucho más avanzada al dejar la reacción de fraguado 24 horas, y los valores de compresión más altos, en comparación con valores de resistencia a la compresión para tiempos de endurecimiento de 4 horas.

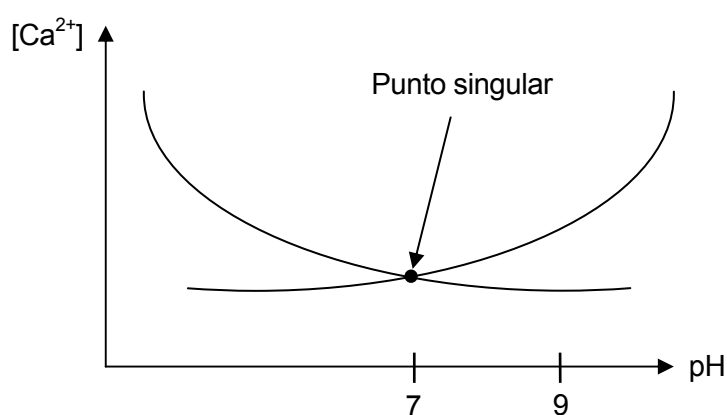


Figura 16. Concentración de iones calcio en solución: Tendencia a la disolución y precipitación de fosfatos de calcio en función del pH (Adaptado de Ref. 22).

Las fotografías de Microscopia Electrónica de Barrido (figura 18) muestran la microestructura de los cementos, para cada relación Calcio/Fósforo, para un endurecimiento de 24 horas. Podemos así comprobar el avance de precipitación de hidroxiapatita para cada caso y correlacionarlo con la resistencia a la compresión. Vemos que para la relación Ca/P la más baja, los cristales de α -TCP casi no se han disueltos. Esto es significativo de una resistencia a la compresión baja. Las fotografías b) y c) revelan una fuerte precipitación de cristales de hidroxiapatita, que parece muy avanzada y uniforme, para una relación Ca/P de 1.50. Esto confirma una resistencia a la compresión muy alta y la influencia de la basicidad sobre ella. Al aumentar la relación Calcio/Fósforo hasta 1.58, observamos cristales de hidroxiapatita precipitados. Sin embargo, quedan cristales de α -TCP no disueltos, característica de una buena resistencia a la compresión, pero no máxima. Las dos últimas fotografías (Ca/P=1.67 y 1.77) muestran que la precipitación se hace, pero que los cristales son muy pequeños lo que significa una precipitación muy lenta. También en este caso se observa que los cristales se agrupan en pequeñas colonias de cristales. Esta es una



característica que se observa en otros sistemas de precipitación a valores de pH generalmente básicos.

El análisis de la difracción de Rayos-X (ver figura 17) nos da informaciones sobre la composición de los materiales. Así, para cada relación Ca/P, podemos decir cuales son las fases presentes en el cemento. Para una relación Ca/P=1.29, tenemos α -TCP con β -TCP y β -pirofosfato de calcio en pequeñas cantidades, en acuerdo con lo esperado según el diagrama de fases (ver Figura 15). Nuestro óptimo, es decir Ca/P=1.50, se compone en casi totalidad de α -TCP, mientras que para Ca/P=1.51 y Ca/P=1.58, empezamos a tener una fase de tetra calcio fosfato (TTCP). Las relaciones Ca/P altas, como 1.67 y 1.77 presentan un sistema de dos fases, α -TCP y TTCP. Este sistema es conocido porque no se puede utilizar en aplicaciones médicas, al ser muy lenta la precipitación de hidroxiapatita [23]. Esto confirma nuestros valores de resistencia a la compresión. En la figura siguiente se pueden ver los picos correspondientes a las fases presentes.

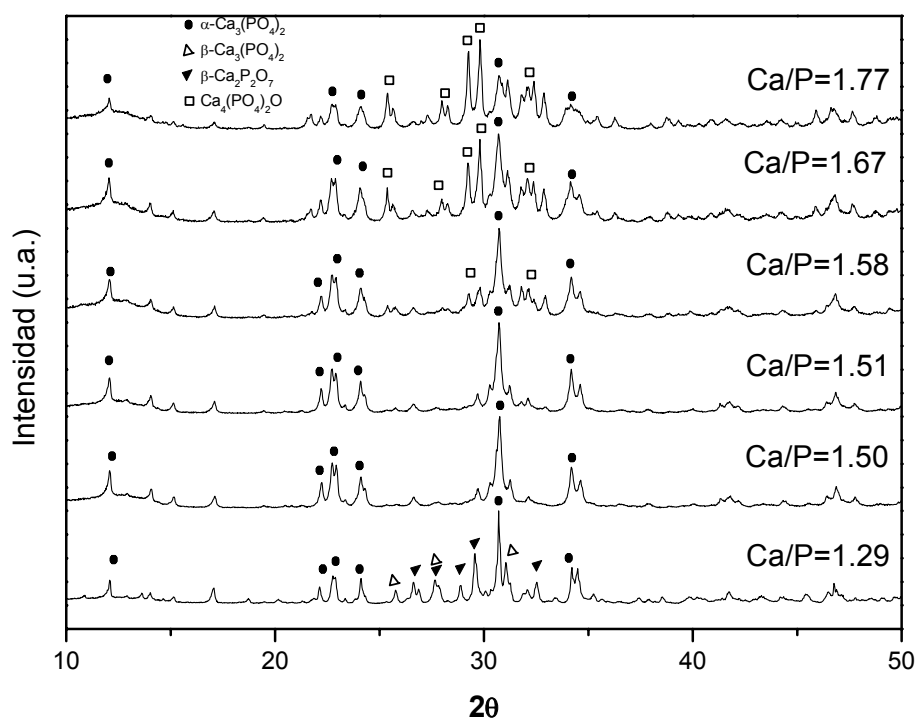


Figura 17. Patrón de difracción de rayos-X de las muestras sinterizadas a distintas relaciones Ca/P.
(Nota: Sólo se identifican los picos principales de las distintas fases presentes)



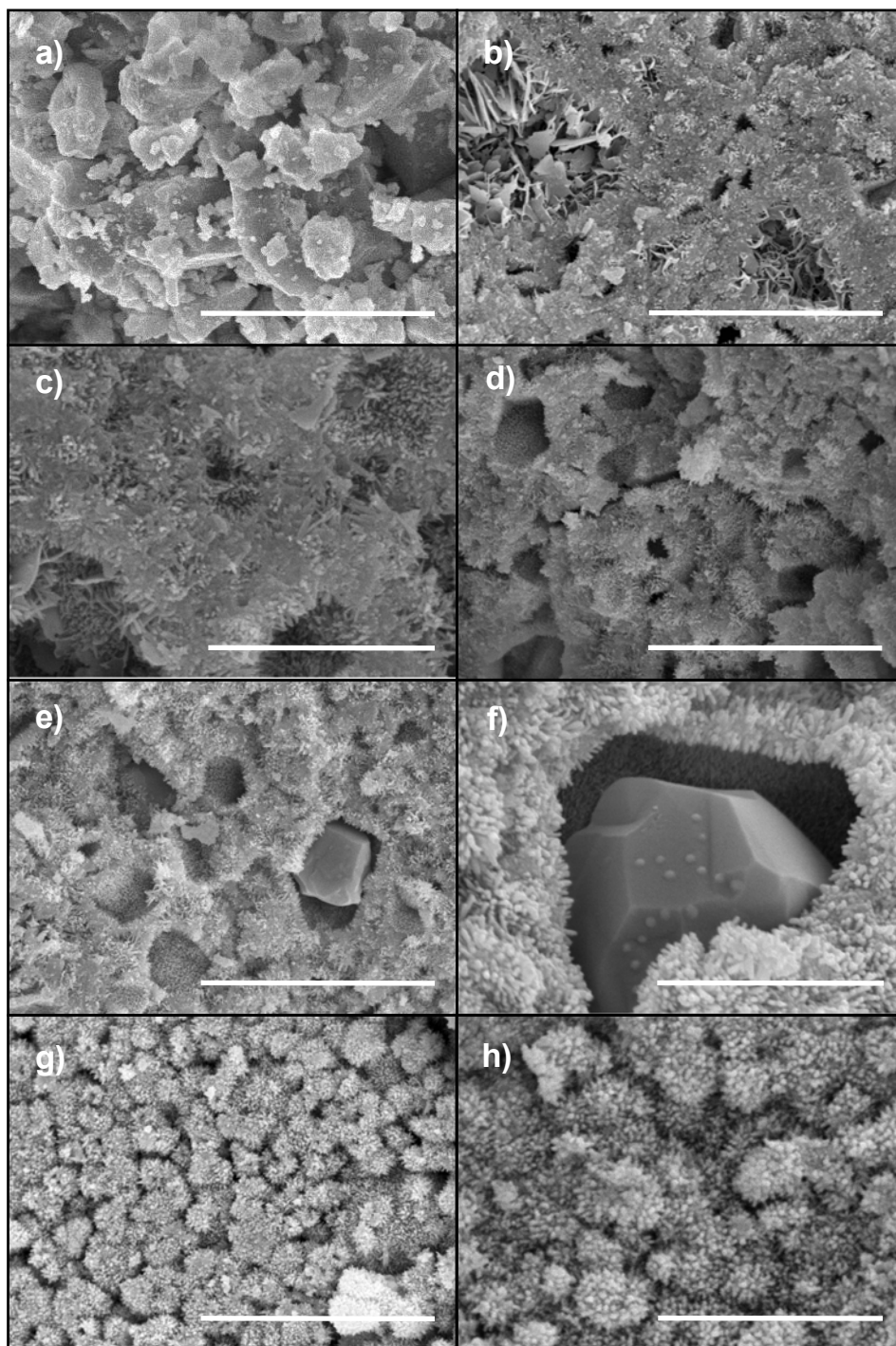


Figura 18. Microestructuras a distintos aumentos obtenidas a las 24 horas de fraguado utilizando como reactivo principal el material cerámico con relación Calcio/Fósforo (Ca/P) variable sinterizado a 1400 °C. (a) Ca/P=1.29 (x6000); (b) Ca/P=1.50 (x6000); (c) Ca/P=1.50 (x15000); (d) Ca/P=1.51 (x6000); (e) Ca/P=1.58 (x6000); (f) Ca/P=1.58 (x15000); (g) Ca/P=1.67 (x6000); (h) Ca/P=1.77 (x12000).



2.4. Conclusión

Esta parte trata de observar las variaciones de resistencia a la compresión y de pH de cementos óseos, añadidos a un estudio de difracción de rayos-X, al modificar la relación Calcio/Fósforo de la fase polvo del cemento.

Se demostró que al aumentar la relación Calcio/Fósforo, el pH aumenta. Así, esta tiene una influencia directa sobre la basicidad de los cementos óseos. Sin embargo, esta basicidad no afecta al cuerpo humano como lo puede provocar pH ácidos. Las medidas de la resistencia a la compresión revelaron un óptimo para una relación $Ca/P \sim 1.50$. La curva ha sido aproximada con una campana de Gauss y los valores más altos y más bajos que el óptimo mostraron valores de resistencia a la compresión más bajas. La difracción de Rayos-X reveló las composiciones de los cementos con diferentes relaciones Calcio/Fósforo. El análisis mostró que, en acuerdo con el diagrama de fase, al cambiar la relación Ca/P , la composición de los cementos cambia, afectando sus propiedades, en particular su basicidad y su resistencia a la compresión.

Este estudio permitió elegir la relación Calcio/Fósforo óptima que utilizaremos en el capítulo siguiente para caracterizar los cementos modificados con aditivos de hierro.



Capítulo 3: Estudio del fraguado de cementos de fosfatos de calcio modificado con hierro

Resumen

Los cementos óseos bioactivos de fosfato de calcio fraguan y se endurecen diferentemente segun su composición y sus aditivos.

Esta parte tiene como objetivo caracterizar las propiedades de cementos modificados con adiciones (en la fase en polvo) de óxido de hierro Fe_2O_3 y nanopartículas de óxido de hierro Fe_2O_3 y con una solución (en la fase líquida) de nanopartículas de óxido de hierro. En un estudio previo, se realizaron ensayos añadiendo citrato de hierro [14]. Se decidió cambiar el aditivo, y ver cómo influye sobre las propiedades de nuestro cemento. Vamos a analizar los tiempos de fraguado que salieron de estos cementos, así como las valores de resistencia a la compresión.

En primer lugar, explicaremos los materiales y métodos utilizados, según las diferentes normativas. Los resultados se trataron con la ayuda de las gráficas de resistencia a la compresión, de fotografías de Microscopia Electrónica de Barrido y curvas de pH y de Difracción de Rayos-X.

Las curvas mostraron que al añadir óxido de hierro, la resistencia a la compresión aumenta. Sin embargo, este efecto no es igual cuando añadimos nanopartículas de hierro, donde los valores son más bajos. Los tiempos de fraguado aumentan todos excepto para el cemento modificado con 8% en peso de nanopartículas que presenta tiempos menores, pero una resistencia a la compresión muy baja. La solución de nanopartículas, por su parte, mostró un buen comportamiento, tanto para sus tiempos de fraguados como su resistencia a la compresión. El análisis de pH mostró que el óxido de hierro influye sobre la basicidad de los cementos al aumentarla.



3.1. Introducción

Los cementos de fosfato de calcio pueden moldearse *in situ* y ajustarse perfectamente a los defectos del tejido óseo, lo que ofrece una muy estrecha aposición al tejido receptor. Esto es el resultado de las propiedades intrínsecas de fraguado y endurecimiento, que ocurren a temperatura ambiente o corporal, dando lugar a la formación de un precipitado de fosfato de calcio.

Un material de tipo cemento consiste en una fase sólida, en polvo, que al ser mezclada con la fase líquida conduce a la obtención de una pasta plástica. Esta pasta viscosa se transformará en una pasta rígida, durante el proceso de fraguado, e incrementará su resistencia mecánica de manera progresiva hasta alcanzar la saturación (endurecimiento). Las propiedades de un cemento, tales como: la plasticidad inicial, los tiempos de fraguado y endurecimiento, y la resistencia final pueden ser controlados a través de factores relacionados con la fase líquida, la fase sólida, la relación líquido-polvo y las condiciones de mezcla.

En un estudio previo [14] se ha investigado el efecto de la modificación del α -TCP con aditivos de hierro, sobre las propiedades de fraguado y endurecimiento del cemento preparado con este α -tricalcio fosfato modificado.

En este estudio se investigaron las propiedades de un cemento de fosfato de calcio modificado con aditivos de hierro, añadidos en la fase en polvo y en la fase líquida. El enfoque de este capítulo fue dirigido sobre los tiempos de fraguado, el pH, la evolución de la microestructura y la resistencia mecánica.



3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Los materiales

En este apartado explicamos el procedimiento experimental para preparar los cementos que luego se estudiaron con los diferentes procesos de estudio y las máquinas adecuadas. En primer lugar se debe listar los materiales que se utilizaron, que sean polvo o líquido, y después trataremos las máquinas utilizadas y el protocolo aplicado para cada estudio.

3.2.1.1. La fase de polvo

Se utilizaron varios tipos de materiales polvos para ensayar a compresión. El primero es el material base del cemento, es decir el fosfato tricálcico α -TCP que preparó la *Robert Mathis Foundation* en Suiza (código: "Cemento Control"). Este polvo ha sido molido para disminuir su tamaño de partículas, para que frague mejor. Cuanto más grandes son las partículas, menos área de contacto hay con la fase líquida, y los procesos de fraguado son más lentos ya que se necesita más tiempo para sobresaturar la solución por disolución y que se inicie la precipitación de hidroxiapatita.

Para modificar los cementos con hierro, se utilizó un polvo de óxido de hierro Fe_2O_3 ($[M]=159.69 \text{ g/mol}$), igualmente llamado maghemita. Este polvo, de color naranja, se mezcló en cantidades de 8% (código: "Cemento 8OH") y 24% ("código: Cemento 24OH") en peso del α -TCP. Finalmente se mezcló el fosfato tricálcico α -TCP con nanopartículas de hierro (γ - Fe_2O_3), también con 8% (código: "Cemento 8Nano") y 24% (código: "Cemento 24Nano") en peso respecto del α -TCP.

3.2.1.2. La fase líquida

Para los cementos con la fase en polvo modificada se utilizó como fase líquida una solución acuosa al 2.5% en peso de hidrógenofosfato de sodio Na_2HPO_4 . Se utilizó esta mezcla porque permite acelerar la reacción de fraguado sin afectar demasiado a las propiedades mecánicas de los cementos.

En el segundo estudio, se utilizó una solución acuosa de nanopartículas de hierro con características de ferrofluido (código: Cemento NanoSol) muy densa ($[\text{maghemita}] = 86 \text{ g/L}$). Esta solución se mezcló después con el α -TCP "Cemento Control", y se ensayaron los cementos a compresión. Esta solución debería ser equivalente aproximadamente a un 3% en peso de nanopartículas añadidas directamente sobre la fase en polvo del cemento control.



3.2.2. El molino de bolas

El fosfato tricálcico que se utilizó tenía en origen (*Robert Mathys Foundation*) un tamaño de partículas de aproximadamente 175 μm . Este tamaño es demasiado grande y hay que reducirlo. Por eso se utilizó un molino planetario de bolas (PM 100 Retsch®). Esta máquina está compuesta de un recipiente de ágata de 500 mL (la ágata es un conjunto de variedades microcristalinas del cuarzo (sílice) y es una piedra dura y resistente a los reactivos químicos que también se emplea para construir pequeños morteros), de un contrapeso para equilibrar las fuerzas que actúan sobre el molino y de un sistema para apretar el recipiente a su zócalo (ver figura 19).



Figura 19. El molino apretado (izquierda) y las 20 bolas de ágata (derecha)

El polvo es molido de la manera siguiente: El movimiento giratorio superpuesto, en sentido contrario, de los recipientes de molienda con respecto a la rueda principal hace que las bolas se muevan con una gran energía de trituración. Las bolas se mueven adheridas a las paredes del recipiente de molienda en la misma dirección del mismo, arrastradas por la fuerza centrífuga ejercida sobre ellas. Durante el movimiento se producen diferencias de velocidad entre las bolas y las paredes del recipiente generándose grandes fuerzas de fricción sobre el material. A medida que continua el movimiento de giro, la fuerza de Coriolis (fuerza producida por la rotación de la Tierra que aparece para cualquier objeto con masa que se desplaza a una determinada velocidad sobre otro objeto en rotación) que actúa sobre las bolas hace que éstas se separen de las paredes del recipiente; éstas comienzan a moverse a través del recipiente de molienda chocando contra el material que se encuentra



en la pared contraria y liberando grandes fuerzas de choque dinámicas. El alto grado de trituración de los molinos planetarios de bolas se debe a la gran interacción entre las fuerzas de choque y fricción (ver figura 20).

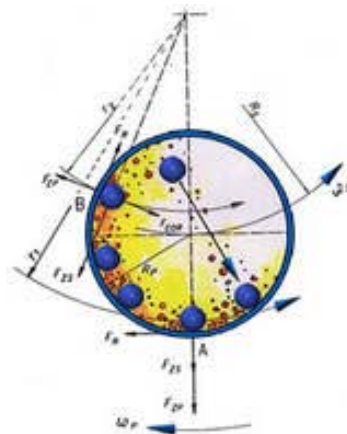


Figura 20. Trayectoria de las bolas en el recipiente

3.2.3. Preparación de los cementos

La preparación de los cementos es algo que es bastante complicado, ya que todo tiene que estar muy controlado. Las muestras que se prepararon fueron todas para efectuar ensayos de compresión y unas para determinar los tiempos de fraguado iniciales y finales de nuestros cementos.

3.1.3.1. Las cantidades

La primera operación consistió en pesar las buenas cantidades de material a introducir, para un coeficiente Líquido/Polvo predeterminado. Se decidió hacer el coeficiente igual a 0.32 mL/g, porque es la relación mínima para que el cemento se trabaje bien y tenga cohesión. Se pesó 5g de α -TCP o de α -TCP modificado con óxido de hierro, y se añadió el líquido equivalente, es decir 1.6 mL de Na_2HPO_4 . Nos permitió hacer 10 muestras cilíndricas de cementos. Para hacer las pruebas de tiempos de fraguado, es un poco diferente. Solo se necesitaba pesar 1g de material y mezclarlo con 0.32 mL de la solución acuosa de 2.5% en peso de fosfato de sodio Na_2HPO_4 . De todas maneras, lo importante no es la cantidad de material que utilizamos sino la relación Líquido/Polvo que debe ser respetada para cada cemento fabricado.

3.1.3.2. Mezclar, rellenar y sacar

El paso siguiente era mezclar líquido y polvo en un mortero para obtener una pasta que se pueda poner en los moldes que tenemos. Se hizo durante un minuto sin parar, para



que el cemento no tenga el tiempo de fraguar y endurecerse, y para que empezara la reacción química entre el polvo y el líquido. Al cabo de este tiempo, se podían rellenar los moldes de acero que tenemos (figura 21). Estos moldes están hechos de acero inoxidable para evitar la corrosión y para que se puedan utilizar durante años. El relleno de los moldes no era sencillo. Hay que recoger la pasta del mortero, y con la espátula se debe apretar fuertemente para que se rellenen los huecos del molde.



Figura 21. Dibujo de un molde de acero inoxidable

El molde debe ser colocado en una placa de vidrio limpia para evitar toda contaminación con otros elementos o materiales. Una vez bien rellenos, las muestras de cemento se dejan fraguar, para el α -TCP "Control" unos 15 minutos y para el α -TCP modificado con 8% y 24% en peso de óxido de hierro, unos 20 minutos, según los tiempos medidos para los tiempos finales de fraguado.

Se sacan las probetas del molde, con cuidado. Para que el ensayo sea lo más preciso posible, la porosidad debe ser mínima, tanto en volumen como en la superficie del cemento. La porosidad influirá sobre los valores de resistencia a la compresión medida, al ser más pequeñas. Después las muestras se ponen en un tubo de ensayo con una solución Ringer, y se dejan en la estufa a la temperatura corporal de 37°C.

Cuando se empezó a mezclar el polvo y el líquido en el mortero, se anota el tiempo. Los ensayos se hicieron para los tiempos de endurecimiento siguientes: 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h y 48 h. Así, se pueden graficar los valores de resistencia a compresión en función del tiempo y analizar su evolución.

3.2.4. Cohesión

La cohesión tiene que ser medida justo después de fabricar el cemento, es decir después de la mezcla de polvo y de líquido en el mortero. Rellenamos un pequeño molde de cobre, sacamos el cemento y lo ponemos en agua para observar su comportamiento (ver 1.3.1 y figura 22).



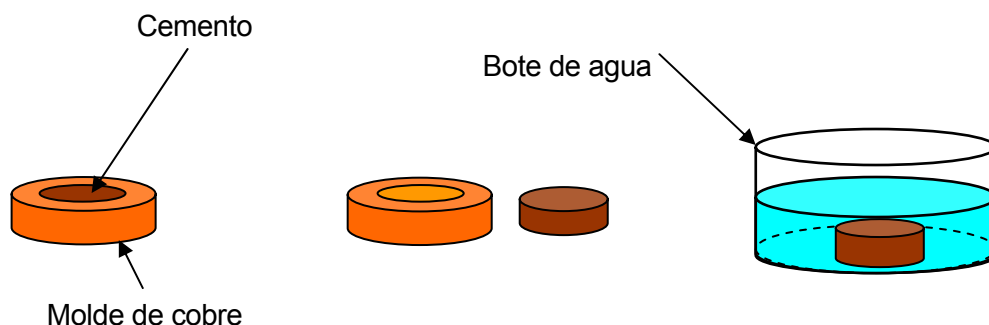


Figura 22. Dibujo del ensayo de cohesión

3.2.5. Los tiempos de fraguado

Para medir el tiempo inicial de fraguado (TIF) y el tiempo final de fraguado (TFF) se utilizó el método Gillmore (ver 1.3.1). Esta operación se hizo para cada nueva serie de cementos, es decir, para el Cemento Control, el 8% y el 24% en peso de óxido de hierro, el 8% y el 24% en peso de nanopartículas de hierro y también para el ferrofluido.

3.2.6. Endurecimiento del cemento

Los ensayos de compresión se hicieron siguiendo el mismo proceso descrito en el capítulo 1 (ver 1.3.2) y el capítulo 2 (ver 2.2.3).

Se ensayaron probetas con distintos porcentajes de hierro, para tiempos de endurecimiento de 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h y 48 h. Se graficaron las medidas de resistencia a compresión en función del tiempo de fraguado.

3.2.7. Caracterización de la microestructura

La evolución de la microestructura de las muestras del “Cemento Control” y del “Cemento 8OH” se analizó, para diferentes de tiempos de endurecimiento, con Microscopia Electrónica de Barrido (SEM; JEOL JSM-5610) (ver 2.2.5).

3.2.8. Medidas de pH

Las medidas de pH se tomaron con un pHmetro universal (*Mettler Toledo*). Se puso en un bote, 200 mL de una solución acuosa al 2.5% en peso de fosfato de sodio Na_2HPO_4 , a la cual se añadió 1g del polvo a medir, en este caso el Control, el Control con 8% y 24% en peso de óxido de Hierro. Se tomaron las medidas de pH cada minuto, durante un tiempo de 27 horas. Las medidas de pH se graficaron después en función de este tiempo.



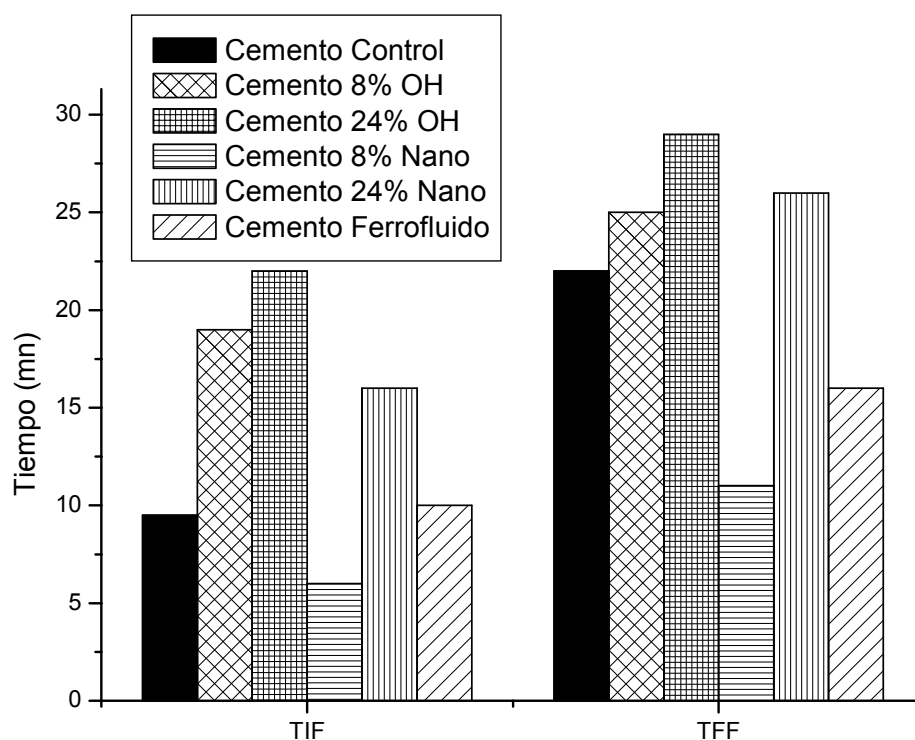
3.2.9. Difracción de Rayos-X

Las muestras del “Cemento Control” y del “Cemento 8OH”secas fueron molidas y caracterizadas, desde el punto de vista de la composición de las fases, mediante difracción de rayos-X (XRD; Siemens-D500). Sin embargo, por cuestión de tiempo no se han incluido porque todavía se están analizando.



3.3. Resultados y discusión

La figura 23 muestra los diferentes tiempos iniciales y finales de fraguados que han salido de nuestras muestras de cementos. La primera observación que se puede hacer está relacionada con la cantidad de óxido de hierro añadida al “Cemento Control”. Está claro que el porcentaje de óxido de hierro influye directamente sobre los valores de tiempo de fraguado, tanto los iniciales como los finales. A más porcentaje de hierro, más grandes serán los tiempos de fraguado. Sin embargo, podemos notar que la diferencia entre el TFF y el TIF disminuye al aumentar el porcentaje de hierro.



Tiempos Iniciales de Fraguado (TIF) y Tiempos Finales de Fraguado (TFF)

Figura 23. *Tiempos de Fraguado Iniciales (TIF) y Tiempos de Fraguado Finales (TFF), para los cementos “Cemento Control”, “Cemento 8OH”, “Cemento 24OH”, “Cemento 8Nano”, “Cemento 24 Nano” y “Cemento NanoSol”*

La observación hecha antes es también válida cuando se añaden porcentajes diferentes de nanopartículas de hierro. La única diferencia concierne al “Cemento 8Nano”, que tiene tiempos de fraguado extremadamente cortos, más cortos que nuestro “Cemento



Control". En realidad, estos cementos tenían que ser trabajados muy rápidamente para que no estuvieran secos y duros (mala trabajabilidad) en el momento de rellenar los moldes. La mala trabajabilidad observada para estas muestras tiene que estar relacionada con un aumento de la adsorción de agua sobre las nanopartículas de hierro que limita la cantidad de agua libre responsable de la plastificación de la pasta, produciendo cementos más secos. Por lo tanto, en este caso, lo que se ha medido es en realidad un falso fraguado. Es decir, las muestras no están fraguando más rápidamente por efecto de la disolución, la precipitación y el entrecruzamiento de cristales; por el contrario lo que tenemos es equivalente a un cemento fabricado con una relación L/P menor de 0.32 mL/g. Por el contrario, el "Cemento 24Nano" mostró tiempos de fraguado superiores al "Cemento Control", aunque ligeramente inferiores al "Cemento 24OH". En este caso también se esperaría una disminución importante en los tiempos de fraguado por el mismo efecto de adsorción explicado anteriormente. Sin embargo, este efecto por sí sólo no explica los resultados obtenidos para este cemento, posiblemente debido a una mayor aglomeración de las nanopartículas al aumentar su porcentaje en peso en la fase en polvo. En cuanto al "Cemento ferrofluido", los tiempos medidos están más en acuerdo con el hecho de corresponderse con un porcentaje en peso real de nanopartículas de óxido de hierro del 3% y con el hecho de encontrarse previamente disueltas y, por lo tanto, homogéneamente distribuidas en la fase líquida, dificultando enormemente la aglomeración de las nanopartículas (TIF=10 mn, TFF=16 mn). Todos estos resultados serán correlacionados con los valores de resistencia a la compresión, que se van a analizar a continuación.



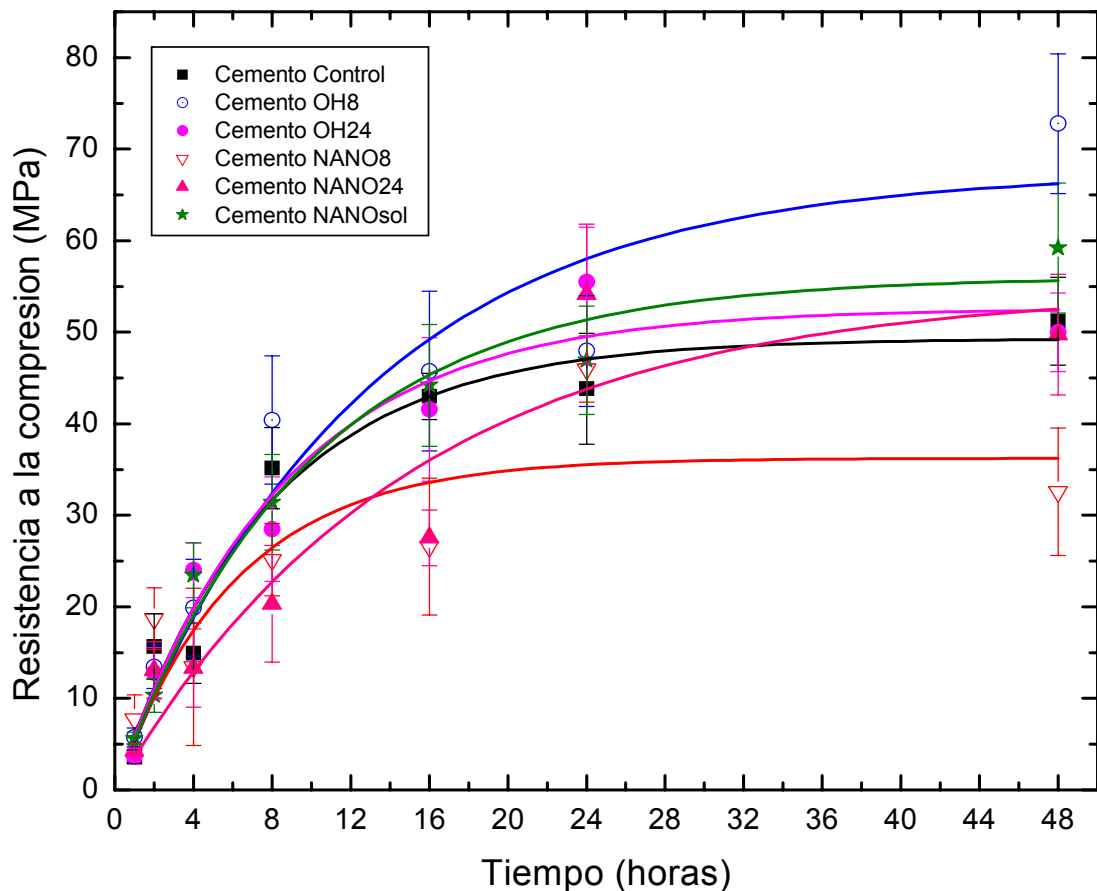


Figura 24. Curvas de compresión de los diferentes cementos ensayados

La figura 24 muestra las curvas de resistencia a la compresión en función de los tiempos de endurecimiento. Las curvas han sido adaptadas con una función exponencial (ecuación 2). La hipótesis principal es que a más porcentaje de hierro, más resistencia a la compresión tenemos. Recordemos que el endurecimiento de cementos de α -TCP es debido a la nucleación, precipitación y crecimiento de cristales de hidroxiapatita deficiente en calcio.

Esta hipótesis es verificada si observamos los resultados de los dos cementos modificados con 8 y 24% de óxido de Hierro ("Cemento 8OH", "Cemento 24OH"). Vemos que la resistencia a compresión es más alta que la del "Cemento Control". Sin embargo, el valor de resistencia a compresión es más alto para el "Cemento 8OH". Estos resultados muestran que el efecto positivo de la adición de óxido de hierro sobre la resistencia mecánica de estos cementos sólo es válido en un intervalo concreto de la cantidad de adición. Superado el valor óptimo el efecto se vuelve contrario. Una posible explicación habría que buscarla teniendo en cuenta la distinta fuerza iónica de las soluciones resultantes por efecto de la adición. Sin embargo, con los datos que tenemos no es posible asegurar esta explicación. Es por esto que la curva de resistencia a la compresión del "Cemento 24OH" se ubica entre el "Cemento Control" y el "Cemento 8OH".



Al mirar los valores de compresión para los cementos modificados con nanopartículas de hierro, vemos que al principio de la reacción las curvas de resistencia a la compresión del “Cemento 8Nano” y del “Cemento 24Nano” son más bajas que la curva del “Cemento Control”, y la del “Cemento 8Nano” está más alta que la del “Cemento 24Nano”. Sin embargo, después de una reacción de fraguado de 14 h, la resistencia a la compresión del “Cemento 24Nano” aumenta y se pone más alta que la del “Cemento 8Nano”. Al cabo de 48 h, el “Cemento 24Nano” es más alto que el “Cemento Control”. En general la experiencia dice que los cementos con tiempos de fraguado más largos poseen resistencias mecánicas más bajas a tiempos cortos pero mayores a tiempos largos. Este resultado suele estar confirmado por un desarrollo de cristales más pequeños que evolucionan más lentamente pero que resultan en estructuras más compactas (mejor resistencia mecánica) a tiempos mayores. Los resultados de SEM deberán aportar una posible explicación a estos resultados, tal como veremos más adelante. En cuanto a la solución de Ferrofluido, está superior a las curvas de los cementos modificados con nanopartículas de hierro y del “Cemento Control”. Este resultado confirma en general toda la tendencia observada, ya que un 3% en peso de nanopartículas previamente disueltas (porcentaje equivalente) dan un resultado en compresión por encima de los resultados del cemento control pero inferiores al porcentaje óptimo del 8%. Además, muestra claramente que la posible aglomeración que también debería observarse en la muestra del 8% va en contra de obtener resistencias mecánicas mayores. En definitiva, estos resultados indican que este sistema puede todavía mejorarse si se incrementa la cantidad de aditivo pero previamente disuelto en la fase líquida del cemento.

En el apartado siguiente intentamos entender y correlacionar estos resultados con fotografías de Microscopia Electrónica de Barrido.

Las figuras 25 y 26 revelan la evolución de la microestructura de dos cementos: el “Cemento Control” y el “Cemento 8OH”. Mostramos, para cada cemento, una fotografía de su microestructura, a distintos aumentos (x1500 y x10000), para tiempos de endurecimiento diferentes: 1 h, 8 h, 16 h, y 48 h. Lo que ocurre es que normalmente, el α -TCP se disuelve, y aparece la fase de cristales de hidroxiapatita. Las fotografías con un tiempo de endurecimiento de 1 h muestran cristales de α -TCP, que son bien presentes y visibles. Sabiendo que el tiempo es corto, estos cristales no se han disuelto. A medida que avanzamos en el tiempo de endurecimiento, se ve que estos cristales se van a disolver para dar lugar a una nueva fase de cristales de hidroxiapatita. Estos cristales aparecen, y, en las fotografías finales, han desaparecido las partículas de α -TCP para dar lugar a una estructura de cristales de hidroxiapatita interconectados.

Los valores de resistencia a la compresión del “Cemento Control” y del “Cemento 8OH” son verificadas por el estudio de las fotografías. Vemos, para el “Cemento Control”, que el α -TCP se disolvió totalmente entre los tiempos de fraguado de 16 h y 48 h, mientras



que en el “Cemento 8OH” aparentemente desapareció entre 8 h y 16 h. Una posible explicación podría estar relacionada con el mayor pH observado para el “Cemento 8OH” frente al pH observado para el “Cemento Control”, como explicaremos más adelante, a lo largo de todo el proceso de endurecimiento y con el hecho de que el pH del “Cemento 8OH” se encontró entorno a 9, que es el valor donde el grado de sobresaturación de la solución respecto de la hidroxiapatita es mayor y, por lo tanto, cuando es más rápida la tendencia a la precipitación de la hidroxiapatita [22]. Es por eso que la curva del “Cemento 8OH” es más alta que la curva del “Cemento Control”. De todas formas, un análisis por difracción de rayos-X demostraría con total seguridad qué fases se están disolviendo, qué fases están precipitando y qué proceso va más rápido. Por cuestión de tiempo, este análisis no se ha podido incluir en este proyecto.

Si miramos las fotografías (figura 27) de Microscopía Electrónica de Barrido del cemento con 8% de óxido de hierro para un tiempo de endurecimiento de 48h en comparación con el cemento con 8% de nanopartículas de hierro para un tiempo de endurecimiento de 5 días, podemos comprobar el avance de la reacción. Se ve que la precipitación de cristales de hidroxiapatita está muy avanzada, para los dos cementos. Sin embargo, vemos que para el “Cemento 8Nano” los cristales de α -TCP no se han disuelto totalmente. Esto es así, porque para el “Cemento 8Nano” el pH de la solución es mayor que 9 y según las curvas de solubilidad [22] el grado de sobresaturación de la solución respecto de la isoterma de la hidroxiapatita disminuye y, por lo tanto, los procesos de disolución y precipitación se retardan. Curiosamente, estos resultados están de acuerdo con los resultados de pH, resistencia a la compresión y las microestructuras de SEM que se observaron en el primer estudio de este PFC (ver capítulo 2). Si comparamos las fotografías de SEM obtenidas en este estudio (ver Figura 27) con las obtenidas en el capítulo 2 para las muestras de relación $\text{Ca/P} > 1.58$ vemos que son muy parecidas, mostrando agrupaciones pequeñas (a modo de coliflor) de cristales también más pequeños. Comparando este estudio con el estudio del capítulo 2 vemos la importancia que tiene el pH de la solución sobre el control de la microestructura del cemento y, por lo tanto, sobre la evolución posterior de sus propiedades mecánicas. Esto explica que la resistencia a la compresión de este cemento sea baja. Al observar el “Cemento 8OH”, vemos que los cristales de α -TCP casi no se ven. Esto quiere decir que se han disuelto, dejando lugar a los cristales de hidroxiapatita. Así, la resistencia a la compresión es mucho más alta que la del “Cemento 8Nano”. ¡La diferencia de los dos alcanza un valor de 30 MPa! Este es un efecto clarísimo de la importancia que tiene el tamaño de partícula de los reactivos y de los aditivos (y del método de preparación en general) sobre las propiedades de fraguado y de endurecimiento de estos materiales.

En relación con la Figura 27, todavía se puede hacer un último comentario. Este tiene que ver con la observación de que a 15000 aumentos se observa, para la muestra de “Cemento 8Nano”, una agrupación de nanopartículas de óxido de hierro (se comprobó mediante



microanálisis) que explicaría los efectos encontrados en comparación con el “Cemento NanoSol” relativos a la mejor homogeneización de las partículas y su efecto sobre las propiedades mecánicas (ver Figura 24) si éstas han sido previamente disueltas en la fase líquida.

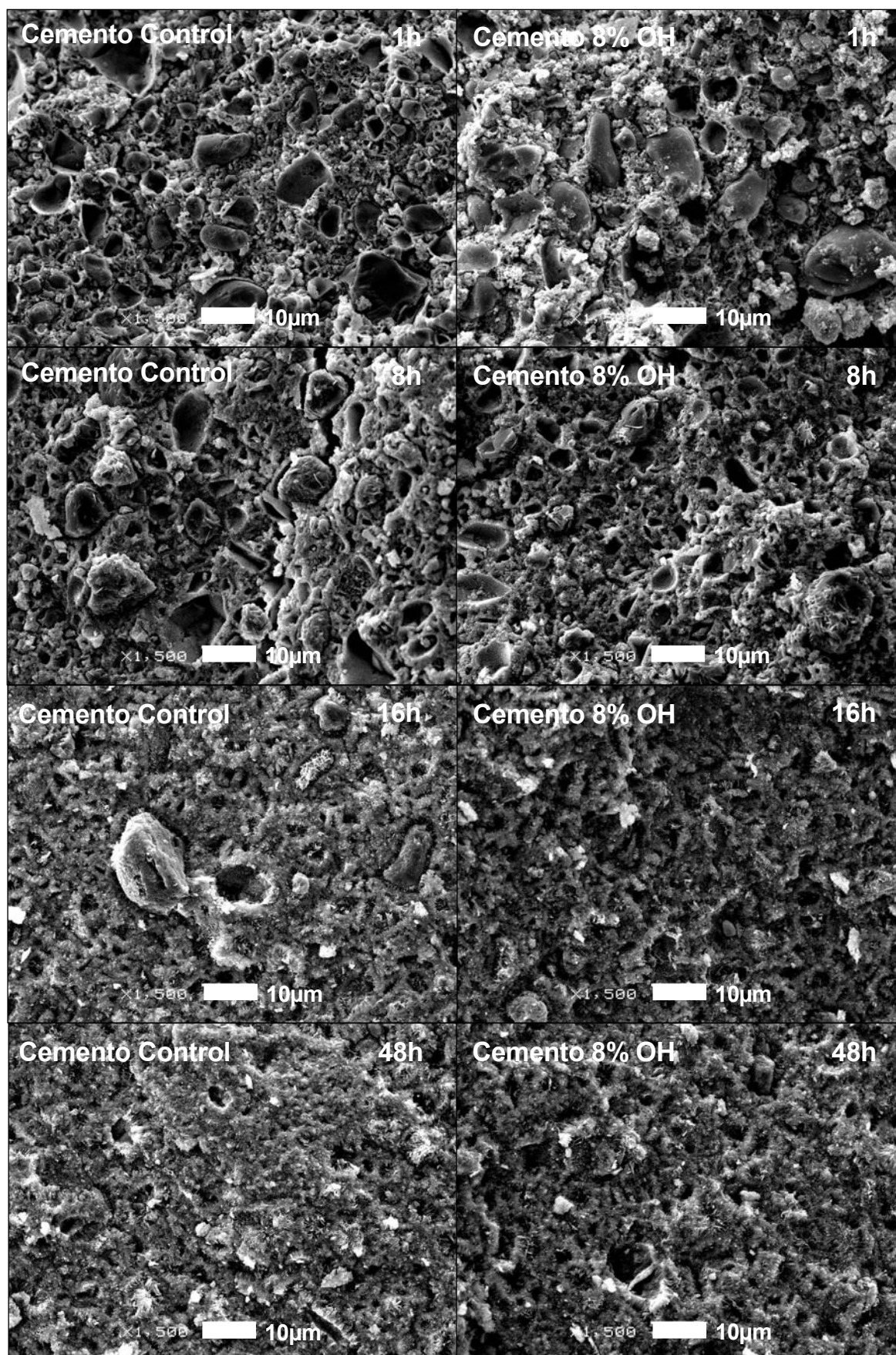


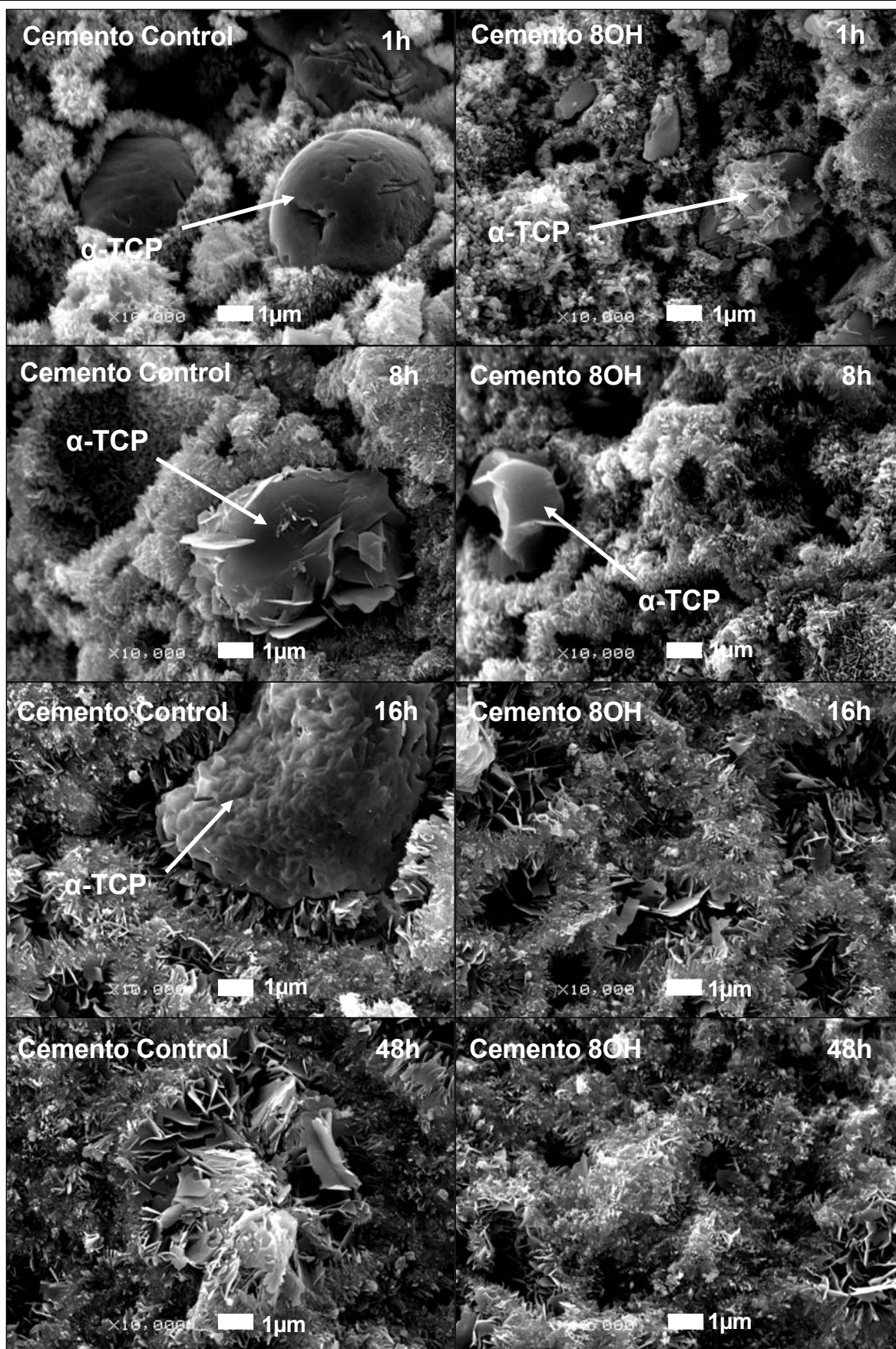
Página 54: **Figura 25.** *Imágenes de microscopia electronica de barrido (x1500) tomadas a diferentes tiempos de fraguado que muestra la evolución de la microestructura del Control y del Cemento con 8% de óxido de Hierro*

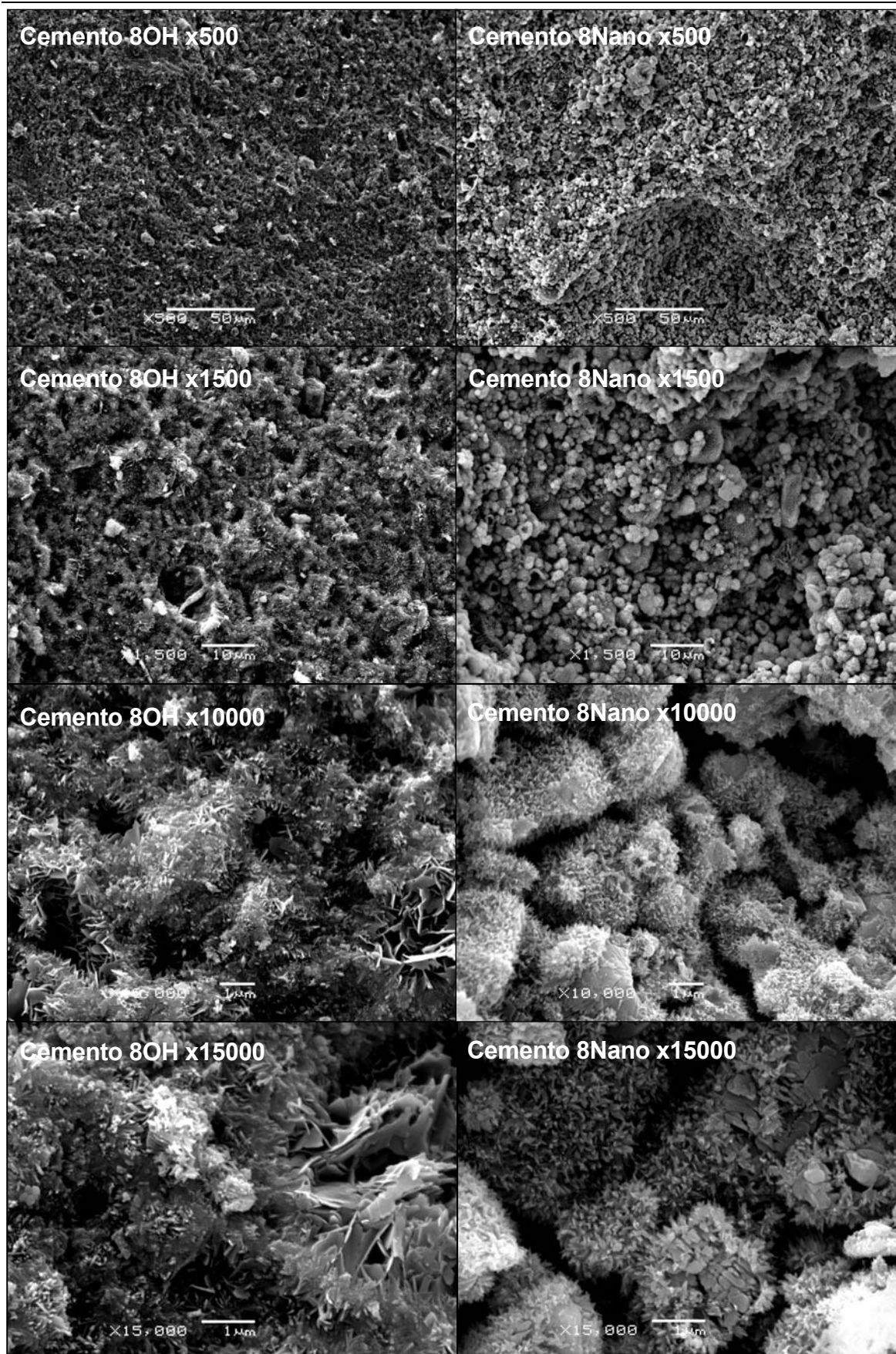
Página 55: **Figura 26.** *Imágenes de microscopia electronica de barrido (x10000) tomadas a diferentes tiempos de fraguado que muestra la evolución de la microestructura del Control y del Cemento con 8% de óxido de Hierro*

Página 56: **Figura 27.** *Imágenes de microscopia electronica de barrido tomadas para un tiempo de fraguado de 48 h (izquierda) y 5 días (derecha) que muestra la evolución de la microestructura del "Cemento 8OH" y del "Cemento 8Nano".*









Esta última figura 28 muestra la evolución del pH en función del tiempo. Lo claro es que el “Cemento Control” tiene un pH menos básico y más cercano a pH neutro que los cementos conteniendo 8% y 24% de óxido de hierro. El valor del pH es importante, además de lo que ya se ha comentado, porque nos da información sobre la posible citotoxicidad del cemento en contacto con el cuerpo humano. Se sabe que un pH ácido es citotóxico y además favorece la proliferación de determinadas bacterias.

Nuestros cementos tienen un pH básico apropiado, lo que permitirá su inyección en el cuerpo humano sin causar complicaciones para el paciente. El pH del “Cemento Control” es inferior al pH de los Cementos modificados con 8% y 24% de óxido de hierro, que tienen valores parecidos. Al cabo de 20 horas, el pH del “Cemento 24OH”, que era superior al del “Cemento 8OH”, baja más rápidamente y su curva se coloca por debajo de la curva del “Cemento 8OH”. De todas formas, estos resultados sólo deben considerarse cualitativamente. Así el porcentaje de hierro añadido influye sobre la basicidad de los cementos.

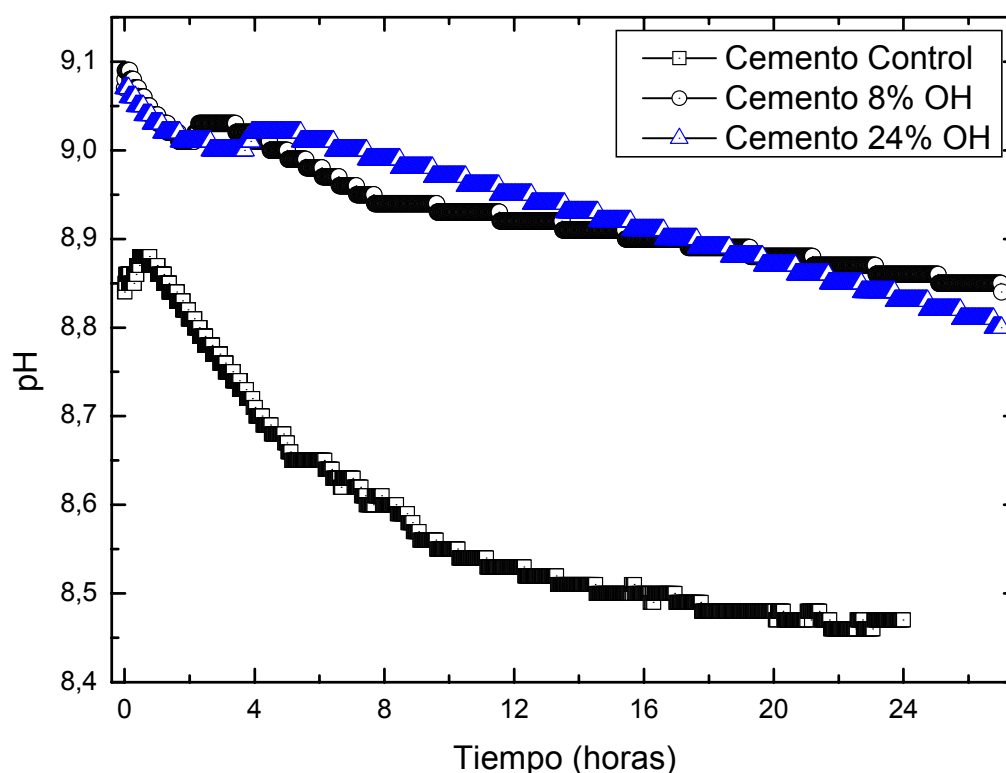


Figura 28. Evolución del pH en función del tiempo (horas) para el “Cemento Control”, el “Cemento 8OH” y el “Cemento 24OH”.



3.4. Conclusión

Esta parte se dedica a caracterizar unas de las propiedades esenciales de los cementos óseos bioactivos: los tiempos de fraguado y el endurecimiento.

Los estudios mostraron que, al modificar el cemento con aditivo de hierro, los tiempos de fraguado se alargan bastante de los tiempos requeridos para aplicaciones clínicas. Sin embargo, se demostró que la resistencia a la compresión es mejorada significativamente al añadir óxido de hierro Fe_2O_3 , pero que no cambia mucho para nanopartículas de óxido de hierro. Las medidas de pH indicaron que el pH aumenta al ser modificado con hierro, lo que indica que influye sobre la basicidad de los cementos. El pH está influenciado por el porcentaje de hierro, pero al ser básico, es aceptable por el cuerpo humano.

Algunos artículos han sido escritos sobre la inyectabilidad de estos cementos [3], lo que requiere un trabajo en coordinación con cirujanos. Una perspectiva futura sería comprobar la inyectabilidad de estos cementos, variando por ejemplo la relación Líquido/Polvo para modificar su viscosidad y así su inyectabilidad. Sin embargo, recordamos que al variar la viscosidad de la pasta, al estar correlacionadas las propiedades del cemento, los tiempos de fraguado como los valores de resistencia a la compresión se modificarán.



Capítulo 4: Estudio de la respuesta magnética de cementos de fosfatos de calcio modificados con hierro

Resumen

Los cementos de fosfatos de calcio, debido a sus versatilidades, son utilizados para aplicaciones en Cirugía de Mínima Invasión (CMI) en aplicaciones como vertebroplastia o kyphoplastia [29]. Algunos investigadores han llevado a cabo estudios de cementos de fosfatos de calcio activados térmicamente útiles en el tratamiento del cáncer óseo.

Este capítulo está enfocado en el estudio de las propiedades magnéticas de cementos modificados con hierro a través de su respuesta magnética al aplicar un campo magnético. Se trazaron los ciclos de Histéresis de cada cemento, con porcentajes de hierro diferentes, y se estudió la permeabilidad magnética relativa de estas pastillas así como su hipotético calentamiento al aplicarle un campo magnético variable.

Las pastillas no han demostrado una respuesta magnética suficientemente notable, a partir de los ciclos de Histéresis, que coinciden todos, o las curvas de imantación. La permeabilidad magnética relativa tampoco se pudo correlacionar con el porcentaje de hierro. Los ensayos de temperaturas tienen que ser investigados más profundamente para sacar conclusiones.



4.1. Introducción

El tratamiento de los tumores es una de las más antiguas terapias registradas en la historia de la medicina. Hoy en día, algunos artículos evidencian la eficiencia de la hipertermia en el tratamiento de los tumores musculoesqueléticos [30].

Una posible vía sería desarrollar cementos óseos bioactivos magnéticos. En este sentido, al aplicar un campo magnético a un cemento al principio de la reacción de fraguado podría modular la resistencia inicial del cemento (magnetoreología), sin afectar a las propiedades mecánicas o al fraguado hasta que la resistencia máxima sea alcanzada [3]. Además, estos cementos magnéticos tendrán una histéresis característica que podría ser utilizada para activar térmicamente y acelerar el proceso entero de fraguado. Esto podría ser útil en el tratamiento térmico de cáncer óseo (terapia por hipertermia). Las cerámicas de vidrio magnéticas son un material muy interesante en este caso [31].

En un estudio previo, se ha obtenido un material cerámico de relación $\text{Ca/P}=1.50$, por sinterización a alta temperatura, en el sistema ternario " $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-FeO}$ " que tiene la habilidad de fraguar como un cemento, al mezclar la fase en polvo con la fase líquida. Se ha evaluado por inspección visual, utilizando un imán estándar Niquel-Cobalto, el movimiento de muestras de este cemento de relación $\text{Ca/P}=1.50$ modificado con hierro, fraguadas a determinados tiempos. Antes de preparar las muestras de cementos, se han analizado con el mismo método tanto fragmentos de materiales como la fase en polvo.



4.2. Materiales, Métodos y Teoría

4.2.1. Ciclos de Histéresis

Esta primera parte tiene como objetivo el estudio de un cemento modificado con diferentes porcentajes en peso (8%: código L8, 16%: código L16 y 24%: código L24) de citrato de hierro, y así sacar su hipotético comportamiento magnético desde un punto de vista macroscópico.

En primer lugar se decidió trazar los ciclos de Histéresis de muestras de cementos, con porcentajes de hierro diferentes. En un segundo tiempo se decidió trazar las curvas de imantación M (unidad SI: Amperio/metro) en función del campo magnético H (unidad SI: Amperio/metro).

Se utilizó un circuito magnético con un entrehierro, dos bloques de acero y una bobina alimentada con corriente continua. Se colocó la muestra de cemento en el entrehierro con una sonda Hall, que permite medir una tensión, y a partir de esta tensión se puede obtener el campo magnético H y la inducción magnética B (unidad SI: Tesla).

En primer lugar se realizó una medida sin nada, sólo con la sonda Hall, para tener una referencia, y con distintas distancias del entrehierro.

4.2.1.1. El ciclo de Histéresis: teoría

Cuando a un material ferromagnético se le aplica un campo magnético, al cesar la aplicación de éste, en el material no se anula completamente su magnetización, sino que mantiene una cierta magnetización remanente. Se produce histéresis cuando al someter el núcleo a un campo creciente, los dominios elementales aumentan en el sentido del campo. Al decrecer el campo, la mayoría de los dominios tienden a una situación similar a su posición inicial. Sin embargo, no llegan a alcanzarla completamente, debido a los rozamientos moleculares, conservando en mayor o menor grado parte de su orientación forzada, haciendo que persista un magnetismo remanente que obliga a cierto retraso de la inducción respecto de la intensidad de campo.

Para desimantarlo será precisa la aplicación de un campo contrario al inicial. Este fenómeno se llama Histéresis magnética, que quiere decir, inercia o retardo.

Cada material tiene su propia curva de histéresis característica. Hay veces en que interesa acentuar la histéresis, como ocurre en los núcleos de las memorias magnéticas. Otras veces por el contrario, como ocurre en la mayoría de las máquinas eléctricas



(transformadores, motores, generadores), interesa un núcleo cuyo ciclo de histéresis sea lo más estrecho posible (el camino "a la ida" coincida con el camino "a la vuelta") y lo más alargado posible (difícilmente saturable). En la figura 29, se puede ver una representación de un ciclo de Histéresis. El campo magnético H se ubica en el eje de las abscisas y la inducción magnética B en el eje de las ordenadas.

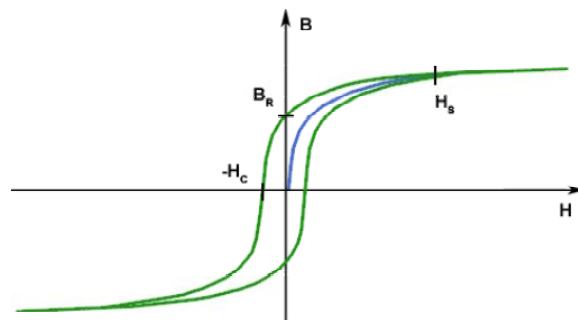


Figura 29. Representación de un ciclo de Histéresis

4.2.1.2. Montaje general

A continuación se explica el sistema experimental utilizado.

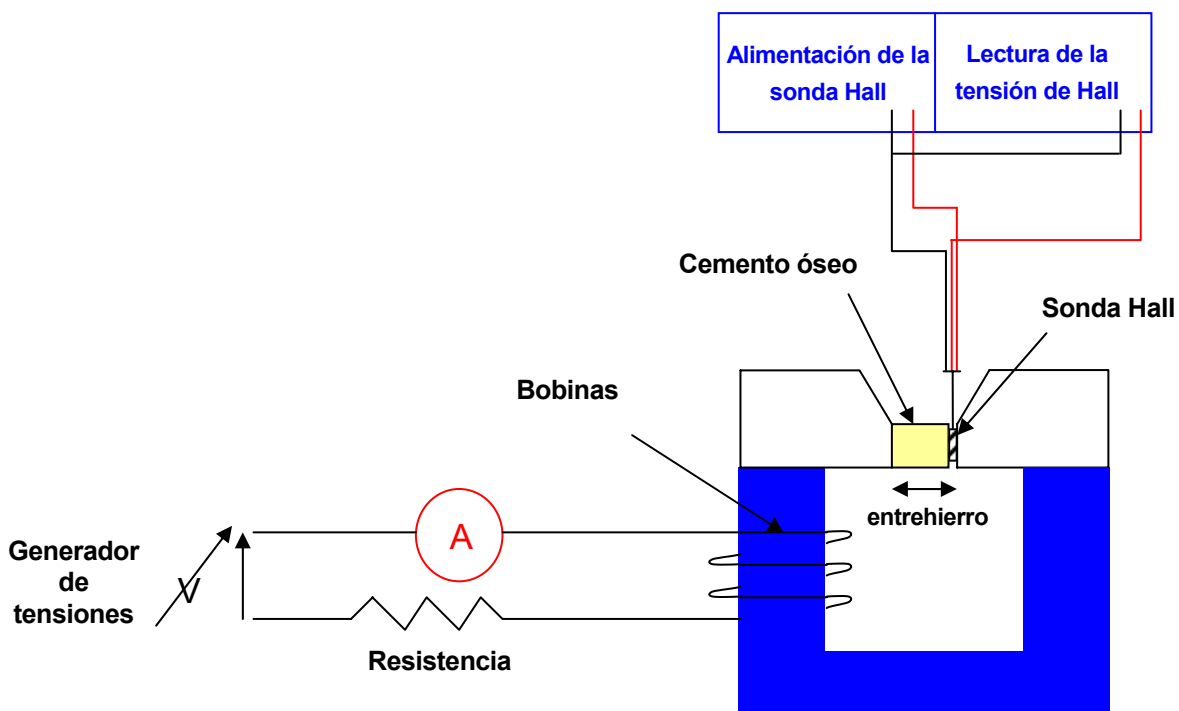


Figura 30 a). Dibujo del montaje



Como se puede ver en la figura 30 a) y b), se compone de dos generadores de tensión (uno da corriente a la bobina del circuito magnético y el segundo alimenta la sonda Hall), un voltímetro para leer la tensión de la sonda hall V_H , y un amperímetro para leer la corriente de alimentación de las bobinas. La resistencia sólo sirve para “suavizar” las medidas.

El cemento óseo se coloca en una zona en la que las expansiones polares del sistema concentran el flujo magnético hacia la muestra de cemento óseo. En serie con la muestra de cemento, se coloca la sonda Hall.

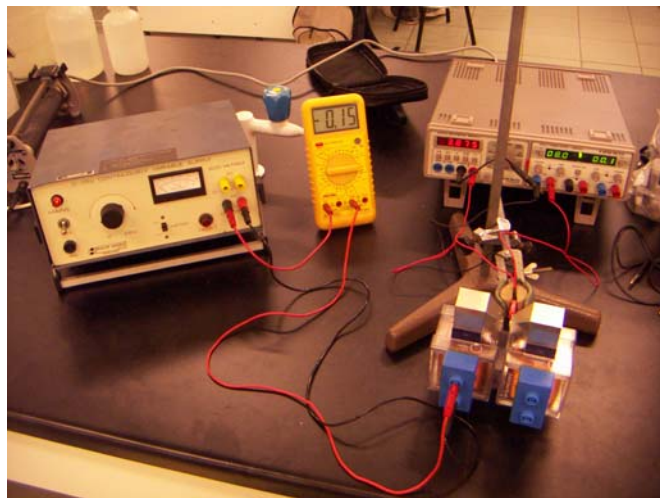
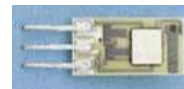


Figura 30 b). El montaje

4.2.1.3. ¿Como funciona la sonda Hall?



Cuando un conductor recorrido por una corriente se coloca en un campo magnético uniforme, aparece un campo electrostático cuya dirección es perpendicular al campo magnético y a la corriente. En un metal, los portadores de corriente son los electrones. Utilizando la figura 31 abajo, al actuar la fuerza de Lorentz ($F_m = q \cdot v \times B$, donde q es la carga del electrón = $-1.6 \cdot 10^{-19}$ C) sobre los electrones, estos serán desviados. Van a concentrarse en la parte inferior, dejando la parte superior cargada positivamente, provocando una diferencia de potencial que es nuestra tensión de Hall V_H (ver figura 31). Esta tensión es proporcional a la corriente y al campo magnético.



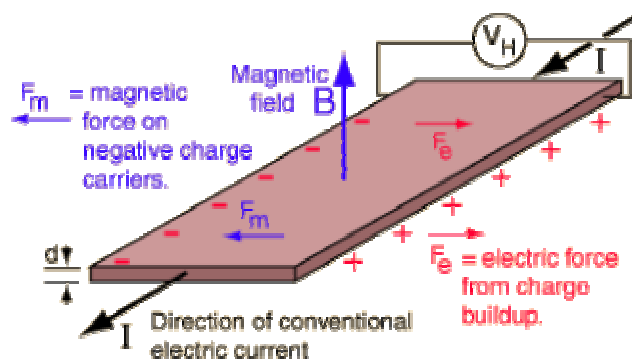


Figura 31. El efecto Hall, donde I es el sentido de la corriente eléctrica, B la inducción magnética, F_m es la fuerza magnética actuando sobre los electrones y F_e es la fuerza eléctrica actuando sobre los electrones

La sonda Hall es el captador que nos da una señal cuando detecta un campo magnético. En este caso la tensión de Hall V_H esta amplificada.

Colocada en un entrehierro como tenemos, nos da informaciones sobre las variaciones del campo magnético establecido en el entrehierro. La figura 32 muestra un dibujo que es muy parecido a nuestro sistema. La sonda Hall es del tipo Honeywell SS94A, y debe ser alimentada con 8 V.

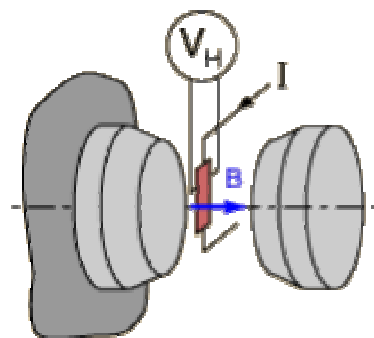


Figura 32. Esquema parecido a nuestro entrehierro, con I la corriente, V_H la tensión de Hall y B la inducción magnética.

4.2.1.4. Trazar el ciclo de Histéresis y la curva de imantación

Para obtener el ciclo de Histéresis, se aplicó una corriente a la bobina del circuito magnético que comprende cinco procesos consecutivos (ver figura 33):

1. La corriente se eleva de 0 a 2.0 A



2. La corriente disminuye de 2.0 a 0 A
3. La corriente se cambia de polaridad y evolucione de 0 a -2.0 A
4. La corriente pasa de -2.0 a 0 A
5. Se repite el proceso 1. La corriente se eleva de 0 a 2.0 A

En todos los casos, se toman medidas de V_H cada 0.2 A.



Figura 33. Intensidad de la corriente aplicada en función del tiempo

Para tener una corriente continua negativa, solo hay que invertir las salidas del generador de tensiones.

Se hicieron los ensayos con entrehierros de (7.0 ± 0.2) mm.

Cuando se acabaron las medidas, se trazó el ciclo de Histéresis de cada serie de ensayos. La corriente de entrada se transformó en campo magnético H en el eje de las abscisas y la inducción magnética B en el eje de las ordenadas.

El valor de la tensión de Hall se puede convertir fácilmente a inducción magnética:

$$1 \text{ V} = 1000 \text{ mV} \rightarrow 1 \text{ mV} = 1 \text{ Gauss} \rightarrow 1 \text{ Gauss} = 10^{-4} \text{ Tesla}$$



La corriente se cambia a campo magnético conociendo la relación siguiente donde H es el campo magnético, N el número de espiras (N=600), l la longitud de la bobina (l=0.050m) y I la corriente aplicada:

$$H = \frac{N}{l} \cdot I$$

Para trazar la curva de imantación de los cementos, solo necesitamos utilizar la relación entre B, H y M que dice:

$$B = \mu_0 \cdot (H + M)$$

Entonces sacamos M, y se puede calcular como conocemos H, B y μ_0 :

$$M = \frac{B}{\mu_0} - H$$

4.2.2. Permeabilidad magnética relativa (μ_r)

En esta parte vamos a intentar ver la variación de la permeabilidad magnética relativa según el porcentaje de hierro que tenemos en nuestro cemento modificado. Por otra parte, si se puede, correlacionaremos los valores de μ_r con el porcentaje de hierro. La permeabilidad magnética de un material es la capacidad de un material para producir un campo magnético, es decir, concentrar las líneas de flujo magnético y así aumentar el valor de la inducción magnética. La permeabilidad magnética relativa se encuentra fácilmente en un ciclo de Histéresis (ver figura 34). Es la tangente del ángulo que hace la curva de primera imantación del ciclo de Histéresis con el eje de las abscisas:

$$\operatorname{tg} \theta = \mu_r$$

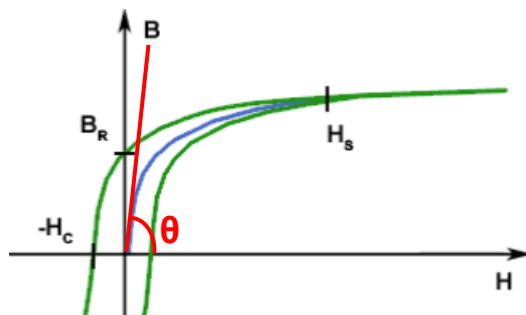


Figura 34. Definición de μ_r con la gráfica de una parte de un ciclo de Histéresis



Los valores de permeabilidad relativa, que es intrínseco al material, cambia según el tipo de material que tenemos. Los materiales se pueden dividir en tres categorías: los diamagnéticos, los paramagnéticos y los ferromagnéticos (ver figura 35). En general, los materiales diamagnéticos y los materiales paramagnéticos tienen una permeabilidad relativa cerca de 1. Es diferente para los materiales ferromagnéticos: sus permeabilidades dependen del campo magnético aplicado H .

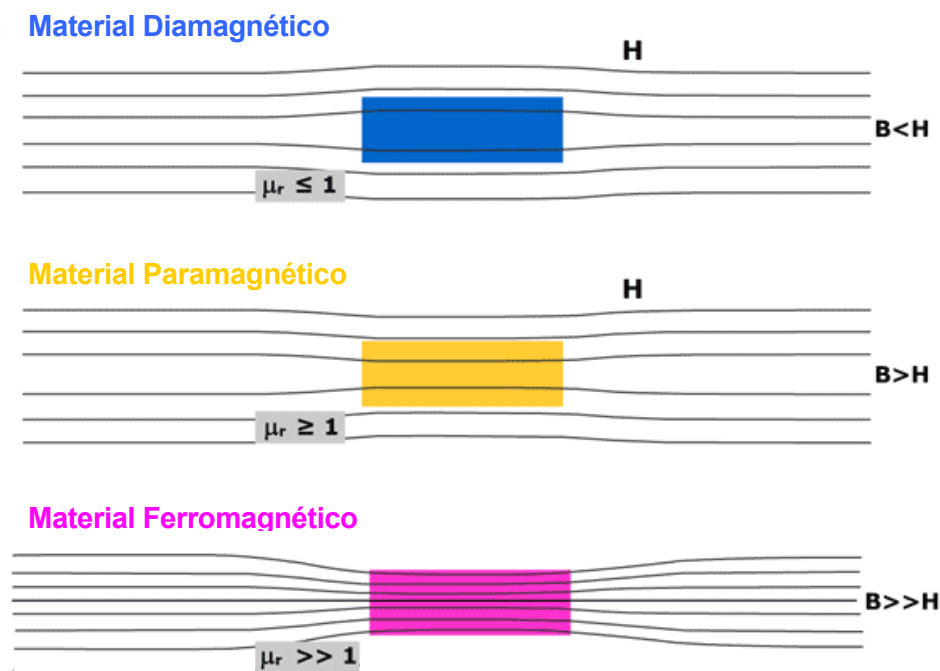


Figura 35. Las permeabilidades magnéticas en los diferentes materiales

Por eso, los valores de permeabilidades son valores máximos. El hierro, que es el elemento que nos interesa, tiene un valor de μ_r alrededor de 10000.

¿Porqué hemos elegido trabajar con este valor? Vamos, a partir del valor de la μ_r de nuestro material, intentar correlacionarlo al porcentaje de hierro que tenemos dentro del material. Para esto, calcularemos la μ_r a partir de un cálculo de reluctancia. La reluctancia magnética de un material es el equivalente a la resistencia magnética que éste posee cuando por él se establece un campo magnético. Es una relación entre la fuerza magnetomotriz y el flujo magnético.

Ahora vamos a explicar cómo se calcula la μ_r .

Para el circuito magnético, igual que el circuito eléctrico, existe una ley equivalente a la ley de Ohm que dice:

$$F = \Phi \cdot R$$



Donde F es la fuerza magnetomotriz, Φ el flujo magnético y R la reluctancia, con:

$$F = N.I$$

$$\Phi = B.S$$

N es el número de espiras, I la corriente aplicada (en Amperios), B el valor de la inducción magnética (en Teslas) y S es la sección (en metros cuadrados).

La reluctancia se calcula así:

$$R = \frac{l}{\mu_0 \cdot \mu_r \cdot S}$$

S es la sección, μ_0 es la permeabilidad magnética del vacío ($\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7}$), μ_r es la permeabilidad magnética del material y l es la longitud del circuito magnético (en metros).

La resistencia total de nuestro sistema es la suma de la reluctancia del circuito de Hierro, del aire en el entrehierro y de nuestra pastilla:

$$R = R_{hierro} + R_{aire} + R_{pastilla}$$

Donde:

$$R_{hierro} = \frac{l_{hierro}}{\mu_0 \cdot \mu_{hierro} \cdot S}$$

$$R_{aire} = \frac{l_{aire}}{\mu_0 \cdot \mu_{aire} \cdot S}$$

$$R_{pastilla} = \frac{l_{pastilla}}{\mu_0 \cdot \mu_r \cdot S_{pastilla}}$$

Sin embargo, como la permeabilidad magnética del hierro es cerca de 10000, se puede despreciar la reluctancia del hierro frente a las dos otras. Para la permeabilidad magnética del aire se toma como valor 1.

$$R = R_{aire} + R_{pastilla}$$



Podemos sacar el valor de la reluctancia total en la ecuación del circuito magnético y reemplazarla:

$$R = \frac{N.I}{B.S}$$

$$R = R_{aire} + R_{pastilla} = \frac{l_{aire}}{\mu_0 . S} + \frac{l_{pastilla}}{\mu_0 . \mu_r . S_{pastilla}} = \frac{N.I}{B.S}$$

De esta ecuación sacamos μ_r :

$$\mu_r = \frac{\frac{l_{pastilla}}{\mu_0 . S_{pastilla}}}{\frac{N.I}{B.S} - \frac{l_{aire}}{\mu_0 . S}}$$

La aplicación numérica es sencilla, porque tenemos todos los valores medidos con las geometrías, que sean del circuito o de la pastilla (ver figura 36):

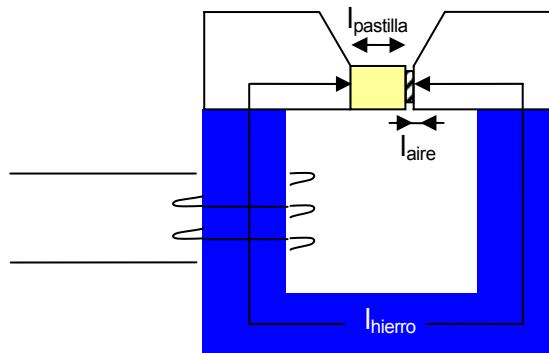


Figura 36. Geometría del soporte magnético con la pastilla y la sonda Hall



4.2.3. Experiencias anexas

4.2.3.1. Influencia de un campo magnético sobre la temperatura

Esta parte tiene como objeto ver si, al aplicar un campo magnético alterno, se calientan las partículas de hierro que están presentes dentro del material, y ver cual es el comportamiento de esta variación de temperatura.

Para ello se utilizó el mismo montaje que se utilizó para trazar los ciclos de Histéresis, con algunas diferencias: en vez de alimentar con corriente continua se aplicó una corriente alterna de frecuencia $F=50$ Hz, y para medir la temperatura se empleó un par de termopares: uno en contacto con nuestra pastilla de cemento, y uno en el laboratorio, a una distancia de dos metros del montaje, para medir las variaciones de temperatura ambiente.

4.2.3.2. Acoplamiento magnético

Esta parte se puede calificar como puramente experimental. A partir de un hilo de cobre, se construyeron dos bobinas de pequeñas dimensiones. Decidimos hacerlas con estas dimensiones para minimizar el efecto del tamaño de las bobinas. Las bobinas utilizadas para los ciclos de Histéresis presentan un tamaño muy superior a nuestras pastillas, y se puede suponer que con un tamaño reducido, se podrá ver un cambio de voltaje, y así un cambio de campo magnético. Para que la bobina sea lo más compacta posible, la hemos enrollado entre dos papeles de acetato, que no influirán sobre el campo magnético.

Las bobinas se conectaron a un generador de tensiones para la más grande, y a un voltímetro para la más pequeña. El objetivo era comprobar si el funcionamiento y si las variaciones de campo eran las mismas que cuando se utilizaba el montaje principal (ver figura 37).

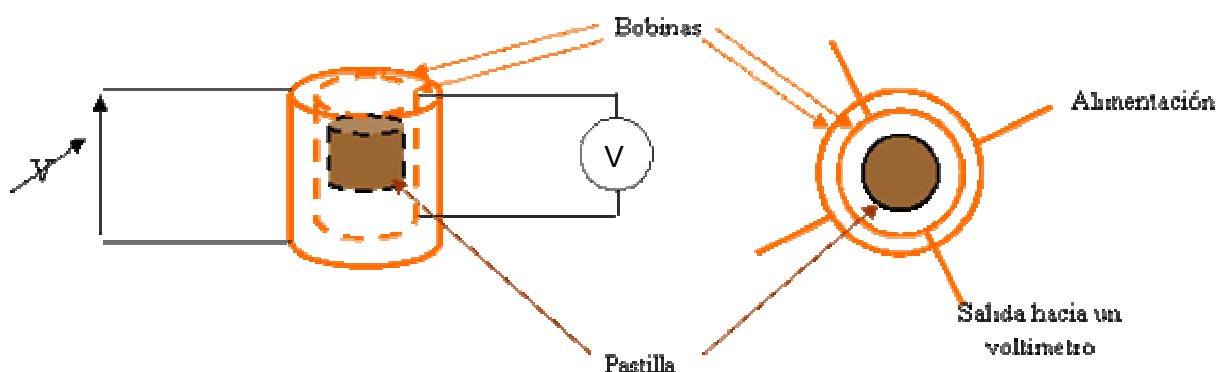


Figura 37. Dibujo del acoplamiento magnético



4.3. Resultados

A continuación se presentan, para su posterior discusión, los distintos resultados obtenidos:

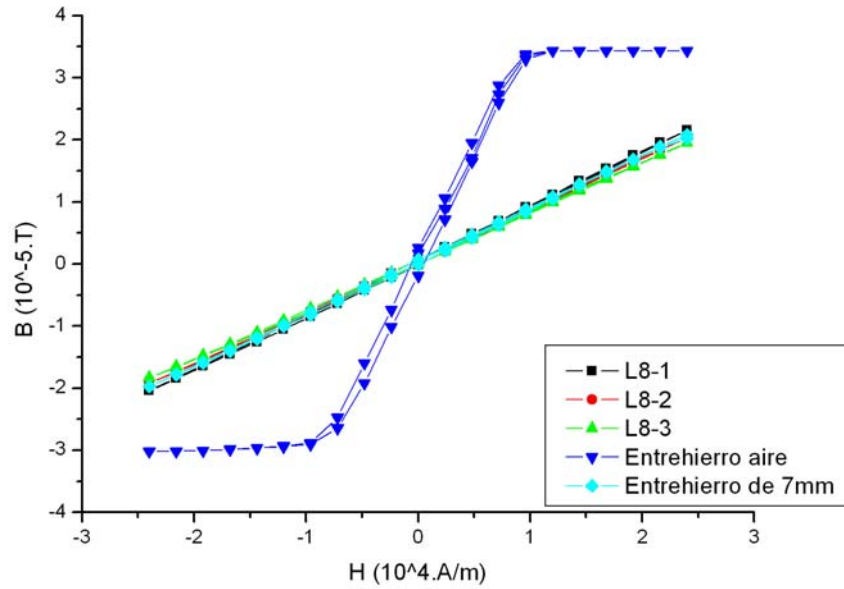


Figura 38. Curvas de Histéresis de un cemento modificado con 8% en peso de citrato de hierro

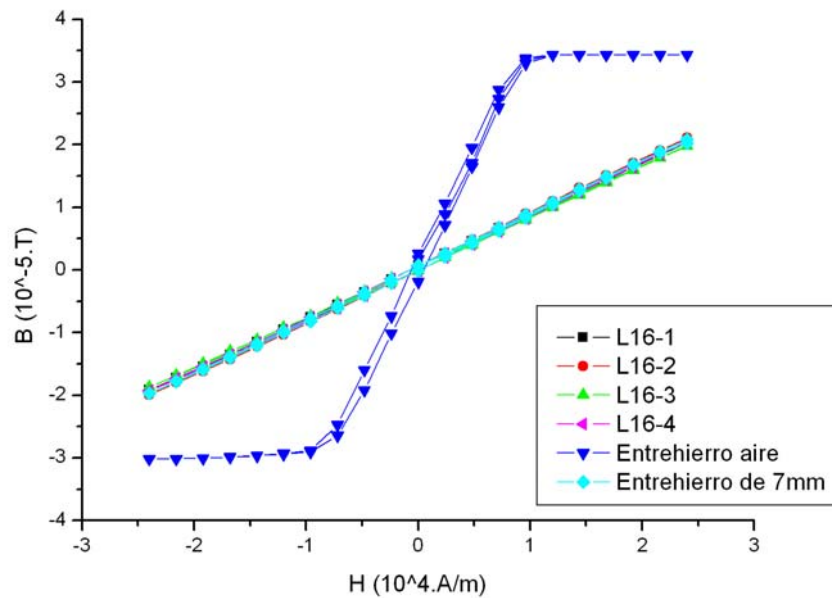


Figura 39. Curvas de Histéresis de un cemento modificado con 16% en peso de citrato de hierro



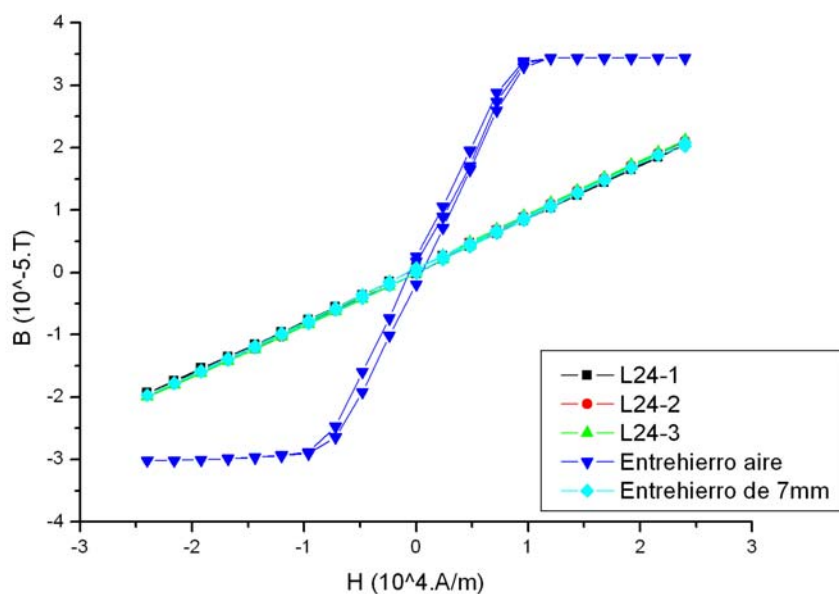


Figura 40. Curvas de Histéresis de un cemento modificado con 24% en peso de citrato de hierro

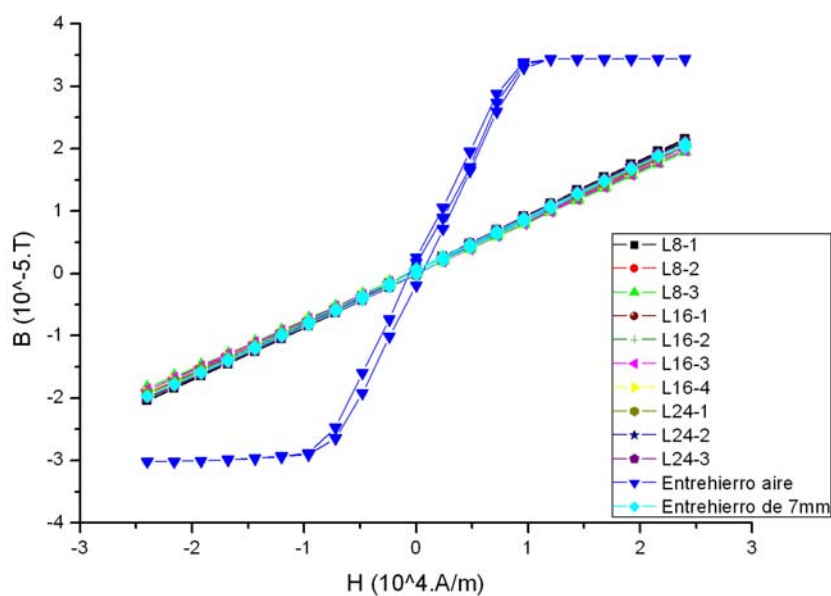


Figura 41. Curvas de Histéresis superpuestas (8%, 16% y 24% en peso de citrato de hierro)



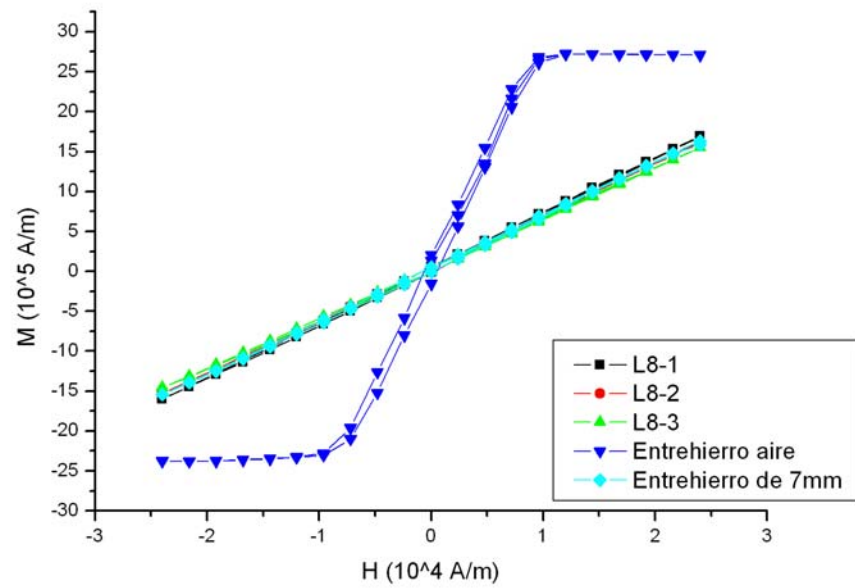


Figura 42. Curvas de Imantación de un cemento modificado con 8% en peso de citrato de hierro

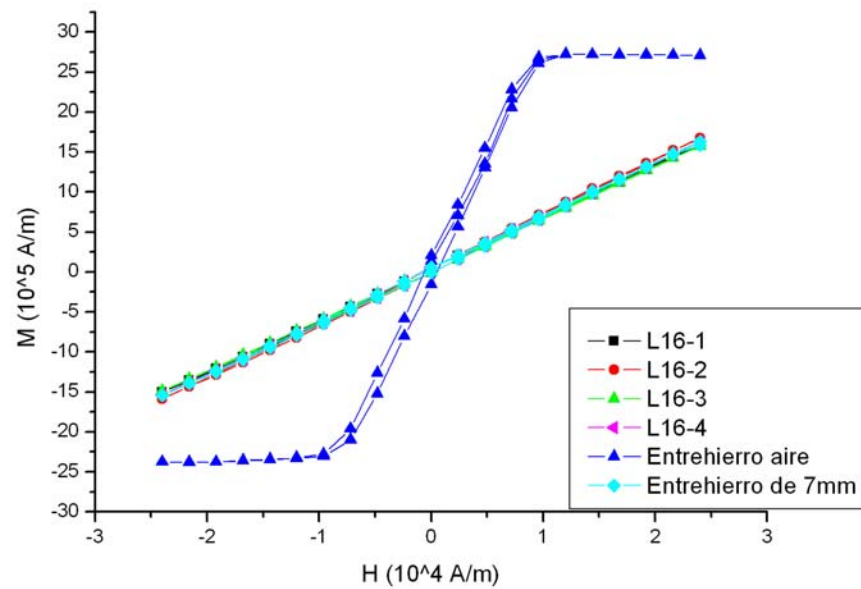


Figura 43. Curvas de Imantación de un cemento modificado con 16% en peso de citrato de hierro



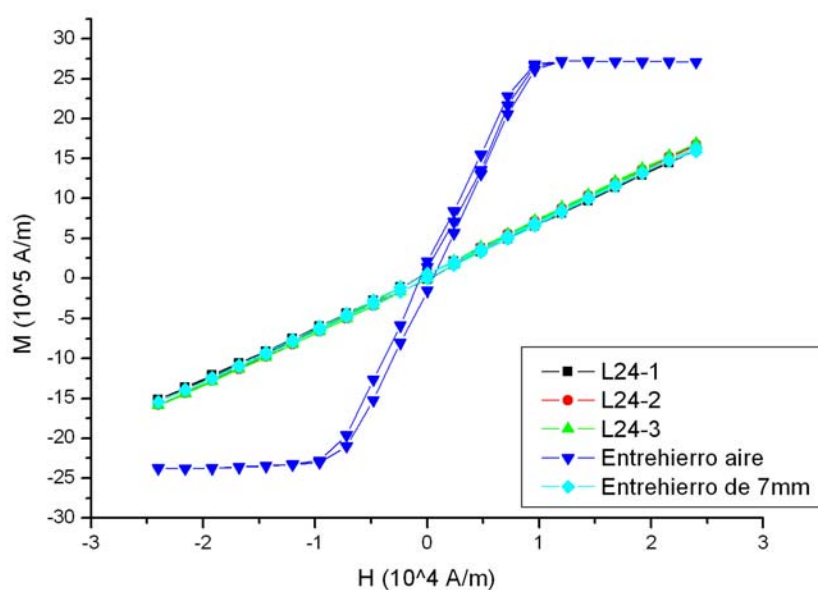


Figura 44. Curva de Imantación de un cemento modificado con 24% en peso de citrato de hierro

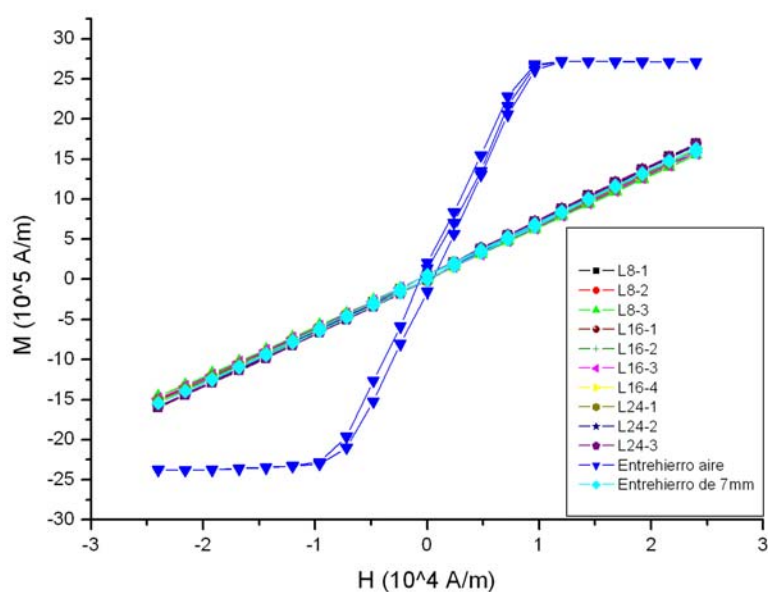


Figura 45. Curvas de Imantación superpuestas (8%, 16% y 24% en peso de citrato de hierro)



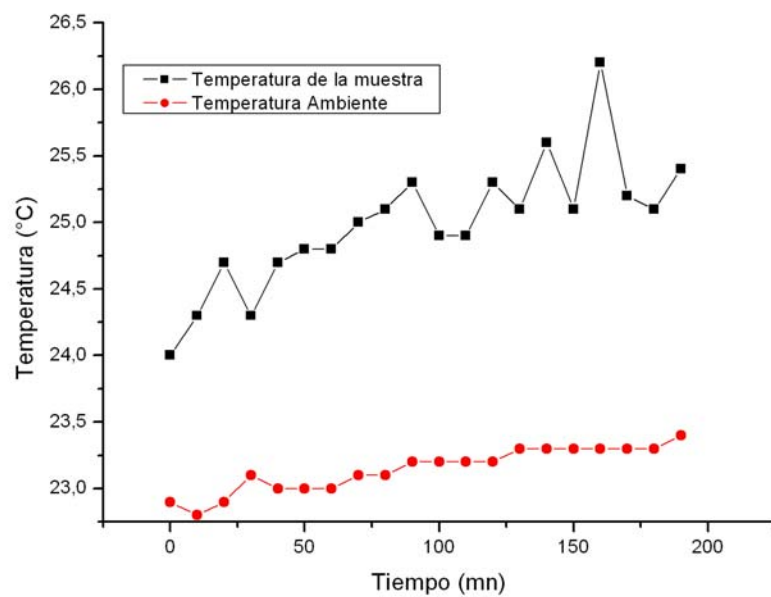


Figura 46. Evolución de la temperatura en función del tiempo

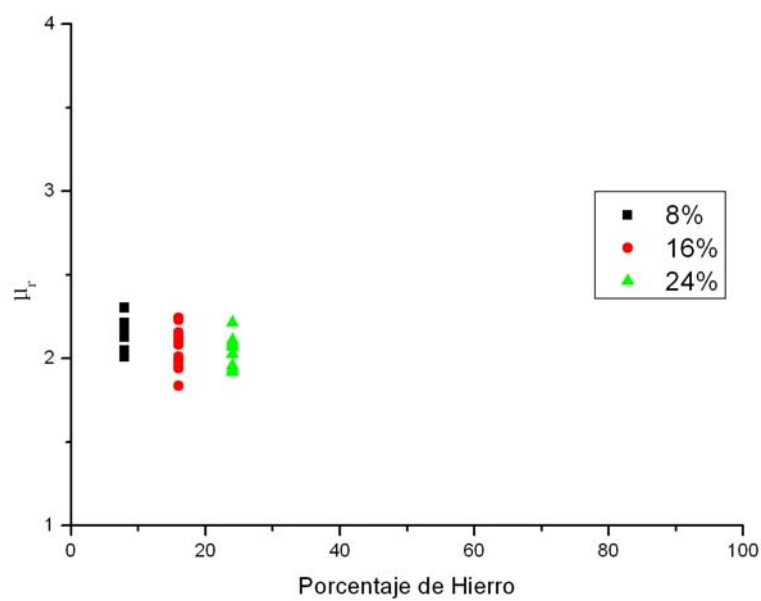


Figura 47. Permeabilidad magnética relativa μ_r en función del porcentaje en peso de citrato de hierro introducido



4.4. Discusión

En esta parte vamos a analizar las diferentes curvas que hemos obtenido. Es conveniente recordar que el objetivo de este apartado era comprobar la posibilidad de detectar el porcentaje de óxido de hierro en las pastillas de cemento realizando medidas magnéticas.

Podemos ver en los diferentes ciclos de Histéresis que casi no se ve ninguna diferencia. Ni entre pastillas ni incluso en su ausencia. La evolución de la curva de un entrehierro de 7 mm, con sólo la sonda Hall sin pastilla, es equivalente y casi superpuesta a las curvas de Histéresis de un cemento modificado con 8% en peso de citrato de hierro (ver figura 38). Para un entrehierro que sólo contiene la sonda Hall, es decir, sin aire con los dos bloques de acero “pegados”, se puede ver un ciclo distinto (como era de esperar). El mismo análisis se hace con las otras curvas de Histéresis, respectivamente con el cemento modificado con 16% y 24% en peso de citrato de hierro (ver figuras 39 y 40). Al ponerlas todas en una misma gráfica (ver figura 41), tampoco se ven diferencias, o son realmente infinitesimales (del orden del μT). Además, se nota que los valores de la inducción magnética son extremadamente pequeños, del orden de 10^{-5} T .

En primer lugar se podría suponer que la corriente aplicada (de -2.0 A a 2.0 A para trazar el ciclo de Histéresis) no es suficiente para generar un campo magnético suficiente que permitiría observar algunas diferencias notable. Sin embargo, nuestro campo magnético es altísimo, del orden de 10^4 A/m . Así que la ausencia de indicador de la proporción de hierro en composición no es del campo aplicado.

Al realizar la última experiencia con las bobinas “experimentales”, tampoco se notaba una diferencia al introducir las pastillas. Sí que se observaba una diferencia al poner entre las dos bobinas un material completamente ferromagnético, como un anillo de hierro. De aquí se puede sacar una de las siguientes hipótesis:

1. El porcentaje en peso de óxido de hierro formado por sinterización durante la obtención del fosfato tricálcico alfa no es suficiente como para conseguir un efecto magnético macroscópicamente mesurable.
2. La distribución en volumen de la fase de óxido de hierro, bloqueada en una red de cristales de hidroxiapatita (ver microestructura de SEM), no facilita la magnetización del material.

En realidad, al crear las pastillas (mezcla del polvo de base, el $\alpha\text{-TCP}$, del polvo conteniendo la fase de óxido de hierro y la fase líquida, Na_2HPO_4), las partículas de óxido de



hierro han sido dispersadas al azar. En este caso, ninguna de las partículas influye sobre sus vecinas, y el campo varía de manera muy pequeña.

En el caso de las curvas de imantación, las diferencias son exactamente iguales, y eso se entiende perfectamente porque M , H y B están relacionados entre sí (ver figuras 42, 43, 44 y 45). Las curvas son muy similares no presentando diferencia alguna a causa de la diferente concentración de partículas de hierro.

En el caso de los ensayos de temperatura, no se puede decir demasiado (ver figura 46). La curva que representa la temperatura en función del tiempo, al aplicar una tensión alterna 50 Hz de frecuencia, muestra que la temperatura va aumentando de manera irregular. Podemos suponer un calentamiento de los cementos modificados, lo que podría suponer una cierta histéresis magnética, a pesar de que la precisión de nuestro sistema experimental indicaba que el sistema se comporta de forma paramagnética. Una perspectiva futura sería seguir estas medidas durante un tiempo mucho más largo, con una máquina automatizada, para sacar una relación entre la temperatura, la corriente aplicada y el tiempo.

Por último, la permeabilidad magnética relativa nos informa que el cemento se comporta como un material transparente al campo magnético, es decir, sin la presencia de partículas magnéticas en su interior, de forma similar a los ensayos realizados sólo con aire en el entrehierro (ver figura 47). En principio, un material con un porcentaje de hierro muy elevado debería tener una μ_r cerca de 10000, mientras que un material con un porcentaje de hierro bajo tendría su permeabilidad magnética relativa cerca de 1. Nuestros valores, entre 2 y 4, son extremadamente bajos y se supone así un porcentaje de hierro extremadamente bajo en las pastillas, resultado que por otra parte no es de extrañar teniendo en cuenta los porcentajes de citrato de hierro añadidos durante la fase de sinterización del fosfato tricálcico alfa.

A pesar de estos resultados, es decir, de no haber sido capaces de medir un ciclo de histéresis de forma adecuada, tal como otros autores han publicado en sistemas parecidos y con niveles similares de adición, todo parece indicar que el factor limitante del experimento reside en el sistema experimental utilizado ya que las variaciones de campo que se quieren medir son extremadamente pequeñas y nuestro sistema no tiene suficiente resolución. Por comparación otros autores llegaron a utilizar un *SQUID* [31]. A pesar de todo, creemos que nuestro sistema experimental de medida todavía puede mejorarse y se han empezado a realizar algunos cambios que esperamos permitan medir con mejor exactitud tanto los ciclos de histéresis como el calentamiento de los cementos por efecto de un campo magnético alterno.



4.5. Conclusión

Esta parte tiene como objetivo el estudio de las propiedades magnéticas de cementos óseos bioactivos.

Hemos demostrado que los cementos utilizados, a través de las curvas de Histéresis, no tienen una respuesta magnética clara y visible como esperábamos. Tampoco se pudo sacar información del cálculo de la permeabilidad magnética relativa.

Sin embargo, podemos añadir que este estudio sólo ha sido el precursor de otros. El tema de detectar las cantidades de aditivo del cemento es importante, para saber como evoluciona durante el tiempo. ¿Se mantiene constante? ¿Baja? Para esto hay que investigar más sobre la instrumentación con la que se podría detectar estas partículas, y adaptarla a una aplicación real.



Capítulo 5: Estudio de biocompatibilidad de los cementos de fosfatos de calcio modificados con hierro

Resumen

Los cementos de fosfato de calcio (CFC) tienen comportamiento plástico excelente antes de endurecer y alta biocompatibilidad después de ser implantado “in vivo”. El fosfato de calcio fragua *in situ* formando una red de cristales de hydroxyapatita, enredados, comparable con la del hueso y está demostrada la buena osteointegración. Estas características hacen que los cementos de fosfato de calcio sean materiales prometedores para la reparación del hueso, en aplicaciones dentales y ortopédicas (estabilizar fracturas del hueso, tumores del hueso y osteoporosis).

En este capítulo se realiza un estudio de la biocompatibilidad de estos cementos óseos modificados con hierro, evaluando la respuesta de los fibroblastos humanos y cuantificando la viabilidad de estas células en la presencia de las muestras del cemento. Corroborando los datos de viabilidad con los valores de adhesión celular, podemos concluir que la modificación del Cemento Control por adición de óxido de hierro en la fase en polvo, no ejerce una influencia citotóxica, debido al hecho de que la tasa de proliferación celular no se ve influenciada durante 3 días de cultivo.



5.1. Introducción

Desde 1985, de cuando Brown y Chow publicaron la primera patente [13] relacionada con los cementos de fosfato de calcio, se han desarrollado y optimizado varias formulaciones de cementos con aplicación en el campo ortopédico, como biomateriales para sustitución o reconstrucción del tejido óseo. Los estudios de resorción de los cementos de fosfato de calcio, tanto *in vitro* como *in vivo*, han sido muy bien documentados y han permitido que este tipo de material sea caracterizado como biodegradable [32].

La reparación y la remodelación del tejido óseo se realizan mediante la actividad de los osteoblastos y de los osteoclastos. La resorción del tejido óseo esta asociada con la actividad de los osteoclastos y por lo contrario, la formación de nuevo tejido óseo está realizada con la participación de los osteoblastos. Estos procesos son interconectados uno con el otro y son responsables de la renovación del esqueleto, manteniendo sus propiedades. Hay que tener en cuenta el hecho de que los osteoblastos existen en diferentes estados de diferenciación, con carácter continuo, y esta característica funcional responde a las condiciones locales del entorno (es decir la presencia de fármacos o iones), y en dependencia con el estado de diferenciación de esta línea celular. Hay condiciones, por ejemplo, cuando algunos iones esenciales en la dieta humana, tales como cromo, níquel y hierro, están presentes en valores que superan los límites fisiológicos, entonces inducen efectos tóxicos consecutivos.

Teniendo en cuenta estos aspectos fisiológicos, se estudió la evaluación de la biocompatibilidad de un cemento ortopédico modificado con óxido de hierro (OH), evaluando la respuesta de los fibroblastos humanos procedentes de la línea celular HEP2 y cuantificando la viabilidad de estas células en la presencia de las muestras del cemento.



5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Preparación del cemento

La fase sólida, α -fosfato tricálcico (α -TCP), del Cemento Control (código: CemContr) fue modificada con determinadas cantidades de óxido de hierro (8 y 24% en peso, añadido en la fase en polvo). Las muestras del cemento modificados con óxido de hierro fueron codificadas como “Cemento 8” (8%) y “Cemento 24” (24%), respectivamente. La pasta del cemento fue obtenida mezclando la fase sólida (el polvo de α -TCP modificado con OH) con la fase líquida, a una relación Líquido/Polvo de 0.32 mL/g. La pasta del cemento para cada formulación fue moldeada para obtener muestras con formas de discos. Estos discos de fosfatos de calcio fueron esterilizados a través de irradiación UV y después, las células fueron sembradas encima de los discos de cemento, para 1 y 3 días (d).

5.2.2. Estudio de viabilidad/citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad o al inverso la viabilidad, las células (fibroblastos humanos procedentes de la línea celular HEP-2) fueron sembradas a una densidad de 1×10^5 células/pozo en una placa de 24 pozos, y mantenidas a 37°C y atmósfera de 5% CO₂.

Después de 1 o 3 días de incubación de las células en los substratos, los cementos de fosfato de calcio “+Control” y el “Thermanox” (código: Therm., sirve de control biocompatible), los medios fueron quitados y la solución del tinte MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) fue añadida en cada pozo. Después de la incubación a 37°C, los cristales de formazán (que se forman dentro de las mitocondrias celulares, como se ve en la figura 48) fueron solubilizados con dimethylsulphoxide (DMSO). La absorbancia fue leída en un lector de placas (ANTHOS 2020) a una longitud de onda de 540 nm. Se calculó la viabilidad celular relativa (%) en función de los pozos del control positivo (+Control) que contenían medio de cultivo (sin muestras de cemento).



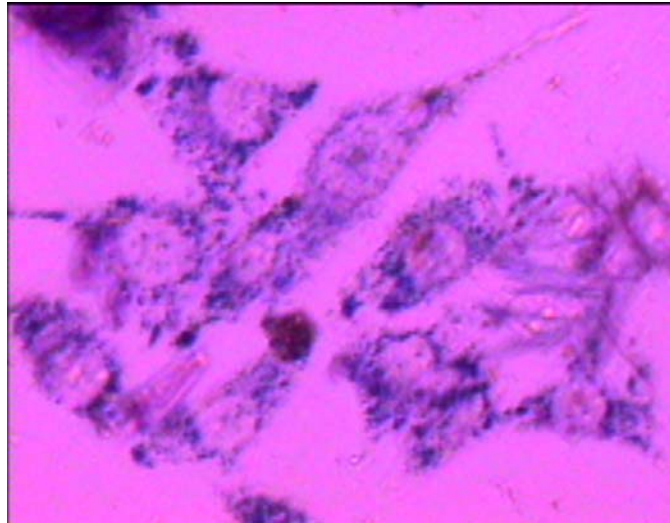


Figura 48. Imagen tomada con un microscopio óptico invertido, que evidencia los cristales de formazan (de color azul-marino) que se forman dentro de las mitocondrias celulares.



5.3. Resultados y Discusión

En la figura 49 se presenta la viabilidad de los fibroblastos, expresada en función de la viabilidad relativa del “+Control”. Los datos se obtuvieron mediante el ensayo con MTT, para cultivos de 1 y 3 días. Los valores obtenidos están representados como media \pm desviación estándar ($n=3$). Hemos incluido en el estudio la serie “+Control” para utilizarla como referencia de la viabilidad y adhesión celular, en el sentido de que hemos cerrado el estudio cuando hemos obtenido una confluencia celular de 95%. Por consiguiente no vamos a hacer ninguna referencia o comparación de los datos obtenidos para la serie +Control con los datos obtenidos para las otras 4 series (Therm, CemContr, Cemento 8, Cemento 24), debido al hecho de que hemos utilizado el Thermanox como material control biocompatible.

Los datos obtenidos (ver figura 49) muestran una ligera tendencia de decrecimiento de la viabilidad celular con el tiempo de incubación, una tendencia que se mantiene dentro de cada serie evaluada. Al comparar los valores de la viabilidad celular después de 1 día de cultivo en la presencia de las muestras Therm, CemContr, Cemento 8 y Cemento 24, se ve que no hay diferencia significativa ($p>0.05$). Es importante destacar que ni después de 3 días de cultivo no se registró una diferencia significativa ($p>0.05$) entre los valores de la viabilidad celular, lo que nos permite afirmar que la tasa de proliferación celular es comparable.

Las dos formulaciones de cemento modificado con óxido de hierro (“Cemento 8” y “Cemento 24”) muestran un comportamiento similar al Thermanox y al Cemento Control: no se observa que bajo ninguna condición, la viabilidad disminuya significativamente.



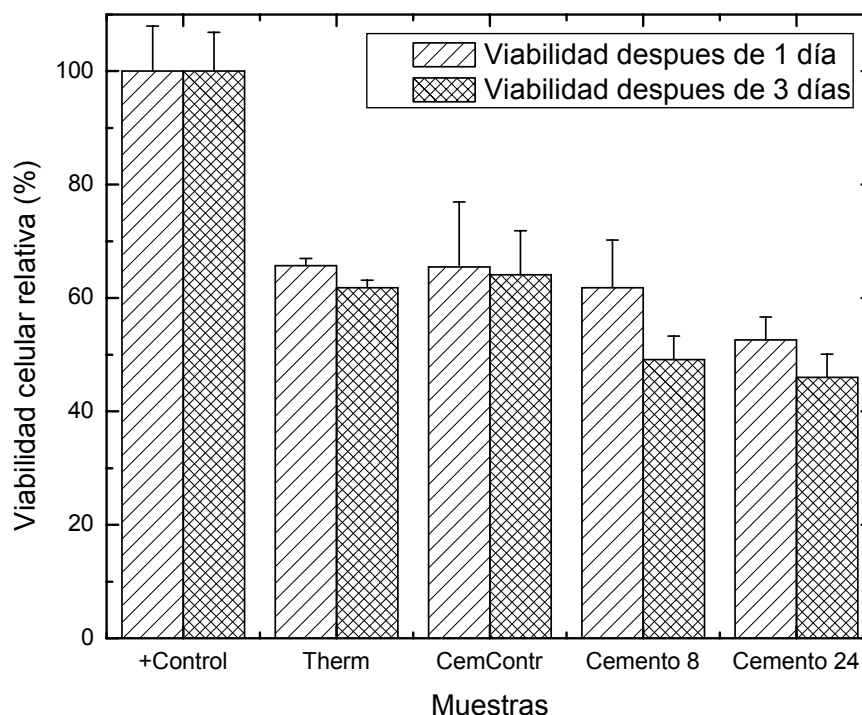


Figura 49. Viabilidad celular relativa versus las formulaciones del cemento: Efecto de la concentración del hierro en viabilidad de los fibroblastos después de 1d y 3d.

La figura 50 presenta el número de células adheridas sobre las muestras correspondientes a las tres formulaciones de cemento ("CemContr", "Cemento 8", "Cemento 24") y sobre las muestras de Thermanox, como material biocompatible, después de 1 y 3 días de cultivo. Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar ($n=3$).

Todas las muestras analizadas mostraron un número similar de células adheridas ($p>0.05$) después de 1 día, comparando las cuatro series entre sí. Después de 3 días de cultivo, se registra un cambio significativo del número de células adheridas en la superficie de las muestras de Thermanox por comparación con los valores de 1 día para la misma serie. La tendencia de incremento del número de células adheridas después de 3 días de cultivo, se mantiene en todas las series analizadas, aunque en el caso del Cemento 8 no es muy acentuada. Es evidente que, después de 3 días el número de células adheridas en las superficies del Cemento 8 y Cemento 24 es inferior, tanto en el Thermanox como en el Cemento Control.



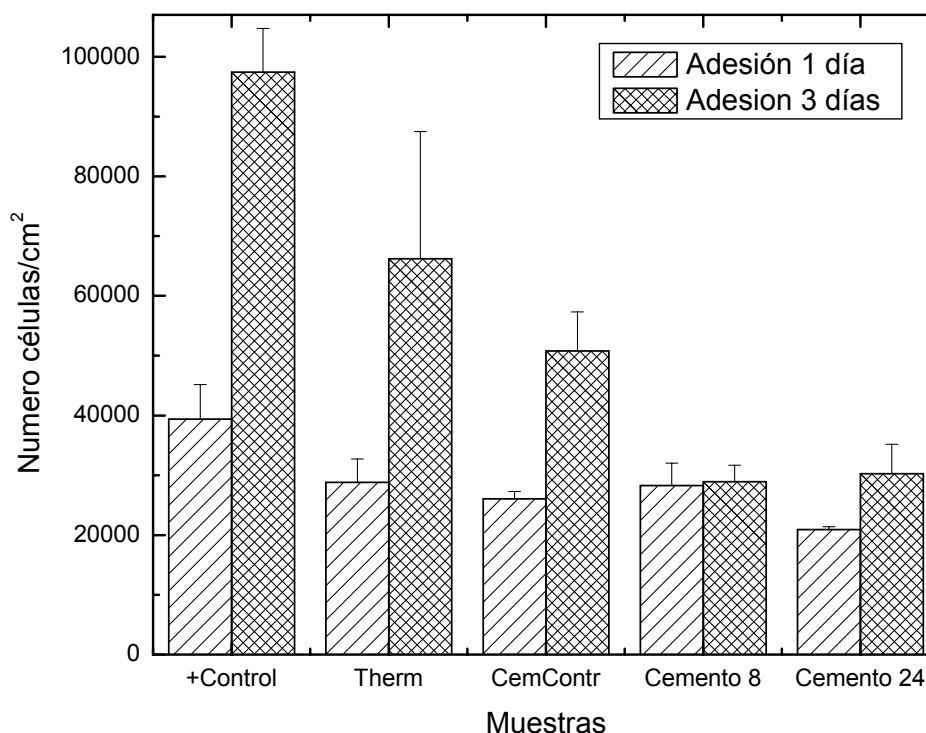


Figura 50. Número de células versus las formulaciones del cemento: Efecto de la concentración del hierro en la adhesión de los fibroblastos después de 1 día y 3 días.

Correlacionando los datos de viabilidad con los valores de adhesión celular, podemos concluir que la modificación del cemento control al añadir óxido de hierro en la fase en polvo, no ejerce una influencia citotóxica, debido al hecho de que la tasa de proliferación celular no se ve influenciada durante los 3 días de cultivo.

Las imágenes (ver figura 51) de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) evidencian las células cultivadas sobre las muestras de Thermanox y del Cemento Control. En las imágenes de la parte izquierda se ven las células adheridas en la superficie de los materiales (Thermanox-arriba; Cemento Control-abajo), estableciendo contactos entre ellas, en el intento de formar una monocapa. En las imágenes situadas a la derecha se presentan detalles de células adheridas sobre una muestra de Thermanox y Cemento Control respectivamente. Las células han desarrollado procesos citoplasmáticos y se han adherido a la superficie de cada material. Estas extensiones citoplasmáticas son regiones de la membrana plasmática que permiten el desplazamiento de las células en la superficie de estos materiales.



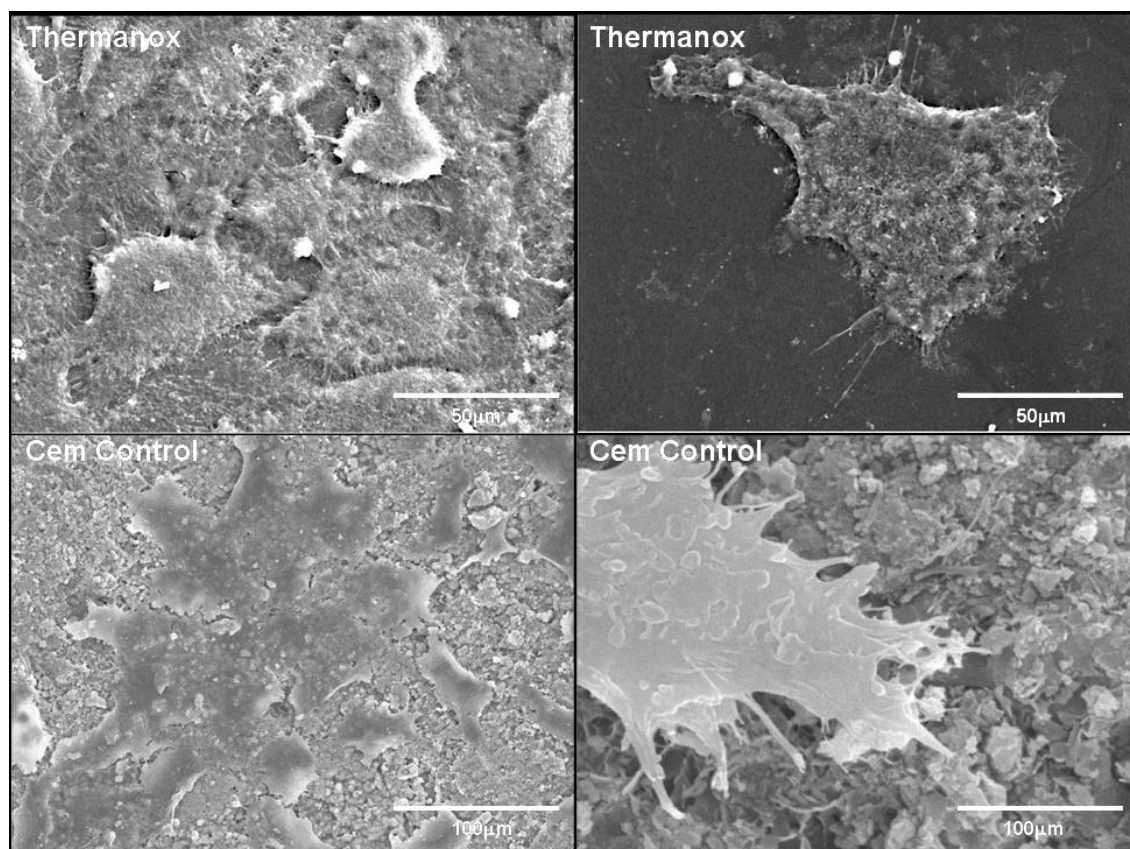


Figura 51. SEM de las células adheridas en la superficie del Thermanox (x1200) y el Cemento Control (x550-izquierda; x9000-derecha), después de 9 días.



5.4. Conclusiones

La viabilidad de los fibroblastos no estuvo afectada por la concentración del hierro añadido de una manera dependiente del incremento de la concentración de este aditivo.

La evaluación de los resultados de citotoxicidad indicó que el Cemento Control modificado por adición de hierro en la fase en polvo, no tuvo un efecto inhibitorio sobre la tasa de proliferación celular, como se esperaba.



6. Conclusión General Final

Este proyecto Fin de Carrera tenía como objetivo la caracterización fisicoquímica de cementos óseos de fosfatos de calcio, que sean modificados o no con aditivos de hierro. Después de un primer estudio o capítulo de revisión bibliográfica, que permitió plantear y entender el funcionamiento, las propiedades y problemas de los cementos óseos bioactivos actuales, se realizaron cuatro estudios.

El segundo estudio mostró la importancia de la relación Calcio/Fósforo en los cementos. Influye sobre la basicidad del cemento, porque al aumentar la relación Calcio/Fósforo se aumenta el pH. Esta basicidad, asociada con procesos de disolución y de precipitación de hidroxiapatita, influye sobre la resistencia a la compresión que baja. Esto se correlaciona también con la composición química: al cambiar la relación Ca/P, la composición química es modificada así como las propiedades esenciales de los cementos (tiempos de fraguado, resistencia a la compresión...).

En el tercer estudio se modificó un cemento óseo con dos tipos de aditivos, óxido de hierro y nanopartículas de hierro. Se estudiaron las propiedades “clásicas” de los cementos, es decir los tiempos de fraguado y la resistencia a la compresión. Se demostró que al añadir óxido de hierro a nuestro α -TCP “Control”, los tiempos de fraguado se ven retrasados. Ocurrió lo mismo para los cementos modificados con nanopartículas de hierro, excepto para un porcentaje bajo (8%). En cuanto a la resistencia a la compresión, se ve mejorada al añadir óxido de hierro, pero se notó una saturación al sobrepasar un cierto porcentaje. En el caso de nanopartículas, el más bajo (8%) presentó la resistencia más débil de todas. El óxido de hierro también influye sobre la basicidad de los cementos óseos al aumentar el pH.

La caracterización magnética no mostró una respuesta aprovechable. Los ciclos de Histéresis como las curvas de imantación y el estudio de la permeabilidad magnética relativa han sido los mismos para cada serie de cemento con porcentajes diferentes.

El estudio de biocompatibilidad mostró un buen comportamiento de los cementos modificados con óxido de hierro al no ser tóxico y no tener un efecto inhibitorio sobre la tasa de proliferación de las células.



7. Costes e impacto medioambiental

7.1 Costes

Esta parte tiene como objetivo aproximar el precio de este Proyecto de Fin de Carrera. Se calcularon los precios de utilización de las diferentes máquinas de cada laboratorio. Para esto tenemos en cuenta la amortización de la máquina, que se supone un 10% de la inversión inicial, excepto para mi ordenador personal, que se supone un 25%. Consideramos que la máquina funciona 10 horas por día y que así son 2200 horas cada año. A este precio se añade los costes de electricidad que se suponen de 3 euros por hora. Los cálculos se dividen en cinco partes distintas:

- ✓ Los materiales
- ✓ Las máquinas utilizadas
- ✓ Coste de trabajo
- ✓ Costes de oficina

Para calcular los precios de recursos humanos, se tomó como referencia un precio de 60€ hora/ingeniero que trabaja en una Ingeniería. Las prestaciones externas se calcularon a partir de los precios de la Universidad de Barcelona. Hemos tomado los precios por hora de un técnico superior, ofertado a empresas, para los servicios de Microscopia Electrónica de Barrido y difracción de Rayos-X, es decir 60€ hora/Técnico (referencia año 2006).



7.1.1. Los materiales

Concepto	Cantidad	Precio/Cantidad	Precio
Fosfato tricálcico alfa	5 Kg	300€/Kg	1500€
Hidrógenofosfato de sodio	25 g	1,40€/g	35€
Óxido de hierro	50 g	2,40€/g	120€
Moldes de acero inox	10	3€	30€
Acetona	2 litros	28,60€/Litro	57,20€
Agua Grifols	10 litros	6€/Litro	60€
Agua destilada	4 litros	1€/Litro	4€
Agua de la red municipal	100 litros	0,2€/Litro	20€
Fungible varios laboratorio	Fija	Fijo	120€
Total			1946,2€

7.1.2. Utilización de las máquinas

Concepto	Precio máquina	Amortización	Precio/h	Horas de uso	luz	Precio
Máquina de Compresión	60000€	6000€	2,73€	40	3€	229,2€
Molino de Bolas	12000€	1200€	0,54€	2	3€	7,1€
Montaje para Magnetización	2400€	240€	0,11€	60	3€	186,6€
Termopar/Sonda	800€	80€	0,036€	8	3€	24,3€
SEM	-	-	11,20€	9	3€	130,5€
XRD	-	-	7,83€	4	3€	34,32€
pHmetro	3500	350	0,159€	52	3€	164,27€
Spectrofotometro	20000	2000	0,90€	1	3€	3,90€



Ordenador personal	1300	325	0,325	276	3€	917,7€
Impresión proyecto	-	-	-	-		40€
Total						1737,9€

7.1.3. Recursos humanos

Fase del proyecto	Días	Horas	Precio
Estudio preliminar	2	4	480€
Estudio bibliográfico	7	28	1680€
Experimentaciones	40	200	8000€
Análisis de los resultados y discusión	7	21	1260€
Redacción del informe	7	42	2520€
Redacción de la presentación oral	3	12	720€
Técnico SEM	3	9	540€
Técnico XRD	1	4	240€
Total			15440€



7.1.4. Recursos materiales

Concepto	Unidades	Precio Unidad	Precio
Libreta	1	1,25€	1,25€
Papel A-4 (500 hojas)	1	3,50€	3,50€
Fotocopias	50	0,05€	2,5€
Rotulador	1	2€	2€
Bolígrafos	2	1€	2€
Lápiz	1	0,30€	0,30€
CD	2	1€	2€
Total			13,55€

7.1.5. Costes de transportes

Concepte	Unidades	Precio Unidad	Precio
T-50/30 TMB	5	27,55€	137,75€
T-10 TMB	6	6,90€	41,40€
Ida-Vuelta Terrassa	3	4,80€	14,40€
Total			193,55€

7.1.6. Coste total

Coste total del proyecto:

19331,2€



7.2. Impacto medioambiental

En esta parte tratamos del impacto sobre el medio ambiente del Proyecto Fin de Carrera.

En primer lugar, cabe destacar que las condiciones de seguridad han sido respetadas perfectamente, para cada ensayo, sobre todo para la resistencia a la compresión donde se utiliza una máquina que puede ser peligrosa. Al principio del proyecto, las máquinas han sido recubiertas de un film protector que se debe poner cada vez que se acaben los ensayos y que se pare la máquina, para evitar que se ensucie la máquina, y así alargar su tiempo de vida.

Para la obtención de las probetas de ensayo, se ha intentado optimizar el material utilizado (el mínimo volumen posible y el menor número de probetas posible) a fin de reducir el consumo energético, el tiempo empleado y minimizar los posibles residuos provocados por el proceso de preparación.

Podemos añadir que nuestro laboratorio, al ser bastante mal insonorizado, puede molestar a la gente que se encuentre al lado. Sin embargo, como nuestras máquinas no hacen mucho ruido, o que las más ruidosas solo se utilicen unos minutos, esto no ocurre.

Al nivel de la contaminación en el aire, no me desplazo en coche, ni en autobus. Utilizo el metro unicamente, que funciona eléctricamente. Y es evidentemente uno de los consumo que más se hizo durante el proyecto. Que sea para conectar mi ordenador, utilizar las máquinas o simplemente para la luz, el consumo de electricidad ha sido enorme.



Agradecimientos

Quisiera agradecer al Profesor Enrique Fernández y a su estudiante de doctorado, Maria Daniela Vlad, por su ayuda y disponibilidad a lo largo de todo el proyecto. Daniela siempre me aconsejó lo mejor que pudo, y gracias a ella sé muchas cosas sobre los cementos óseos y me enteré de cómo organizarme en mi futura vida profesional a su lado. También le agradezco por su trabajo y su ayuda sobre la biocompatibilidad de los cementos.

Igualmente, quisiera agradecer al Profesor José “Pepe” López por su ayuda y disponibilidad. Siempre me explicó los problemas de magnetización, que son muy complejos, lo más sencillamente posible para que lo pueda entender. Además, le agradezco por los partidos de fútbol que me permitieron conocerlo más.

Por fin quiero agradecer a mis amigos, mi familia y a Aude Larvet por el soporte que me dieron durante toda mi estancia en Barcelona.



Bibliografía

Artículos

1. L.L. Hench. "Biomaterials: a forecast for the future", *Biomaterials* 1998;19:1419-1423.
2. J. Black. In: *Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility*, Third Edition, Marcel Dekker, NY, 1999.
3. M. Bohner, G. Baroud. "Injectability of calcium phosphate pastes". *Biomaterials* 2005;26:1553-1563.
4. M.P. Ginebra, E. Fernández, E.A. P. De Maeyer, R.M.H. Verbeeck, M.G. Boltong, J. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.A. Planell. "Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement". *J Dent Res* 1997;76(4):905-912.
5. E. Fernández, M.G. Boltong, M.P. Ginebra, F.C.M. Driessens, O. Bermúdez, J.A. Planell. "Development of a method to measure the period of swelling of calcium phosphate cements". *J Mater Sci Letters* 1996;15:1004-1005.
6. M.P. Ginebra, E. Fernández, M.G. Boltong, O. Bermúdez, J.A. Planell, F.C.M. Driessens. "Compliance of an apatitic calcium phosphate cement with the short-term clinical requirements in bone surgery, orthopaedics and dentistry". *Clinical Materials* 1994;17:99-104.
7. E. Fernández, F.J. Gil, M.P. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.A. Planell, S.M. Best. "Production and characterization of new calcium phosphate bone cements in the CaHPO_4 - α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: pH, workability and setting times". *J Mater Sci Mater Med* 1999;10:223-230.
8. Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic Cement Paste by Vicat Needle, ASTM C191-92, Annual Book of ASTM Standards, vol. 04.01: Cement, Lime, Gypsum. Philadelphia: ASTM;1993:158-160.
9. Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic Cement Paste by the Gillmore Needles, ASTM C266-89, Annual Book of ASTM Standards, vol. 04.01: Cement, Lime, Gypsum. Philadelphia: ASTM;1993:189-191.



10. O. Bermúdez, M.G. Boltong, F.C.M. Driessens, J.A. Planell. "Compressive strength and diametral tensile strength of some calcium-orthophosphate cements: a pilot study". *J Mater Sci Mater Med* 1993;4:389-393.
11. E. Fernández, F.J. Gil, S.M. Best, M.P. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.A. Planell. "Improvement of the mechanical properties of new calcium phosphate bone cements in the CaHPO_4 - \square - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: Compressive strength and microstructural development". *J Biomed Mater Res* 1998;41:560-567.
12. E. Fernández, M.P. Ginebra, M.G. Boltong, F.C.M. Driessens, J. Ginebra, E.A.P. De Maeyer, R.M.H. Verbeeck, J.A. Planell. "Kinetic study of the setting reaction of calcium phosphate bone cement". *J Biomed Mater Res* 1996;32:367-374.
13. E. Fernández, M.D. Vlad, M.M. Gel, J. López, R. Torres, J.V. Cauich, M. Bohner. "Modulation of porosity in apatitic cements by the use of \square -tricalcium phosphate-calcium sulphate dihydrate mixtures". *Biomaterials* 2005;26:3395-3404.
14. E. Fernández, M.D. Vlad, M. Hamcerencu, A. Darie, R. Torres, J. López. "Effect of iron on the setting properties of \square -TCP bone cements". *J Mater Sci* 2005;40:3677-3682.
15. S. Sarda, E. Fernández, M. Nilsson, M. Balcells, J.A. Planell. "Kinetic study of citric acid influence on calcium phosphate bone cements as water-reducing agent". *J Biomed Mater Res* 2002;61:653-659.
16. ISO 9917-1. "Dentistry. Water-based cements. P.1: Powder/liquid acid-base cements". By International Organization for Standardization (ISO). Geneva: ISO, 2003.
17. G. Baroud, E. Cayer, M. Bohner. "Rheological characterization of concentrated aqueous α -tricalcium phosphate suspensions: The effect of liquid-to-powder ratio, milling time, and additives". *Acta Biomaterialia* 2005;1(3):357-363.
18. M. Bohner, T. Theiss, D. Apelt, W. Hirsiger, R. Houriet, G. Rizzoli, E. Gnos, C. Frei, J.A. Auer, B. von Rechenberg. "Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep". *Biomaterials* 2003;24:3463-3474.
19. F.C.M. Driessens, J.A. Planell, M.G. Boltong, I. Khairoun, M.P. Ginebra. "Osteotransductive bone cements". *Proc Inst Mech Eng* 1998;212(H6):427-435.
20. E. Fernández, S. Sarda, M. Hamcerencu, M.D. Vlad, M. Gel, S. Valls, R. Torres, J. Lopez. "High-strength apatitic cement by modification with superplasticizers". *Biomaterials* 2005;26:2289-2296.



21. S. Sarda, M. Nilsson, M. Balcells, E. Fernández. "Influence of surfactant molecules as air-entraining agent for bone cement macroporosity". *J Biomed Mater Res* 2003;65A:215-221.
22. E. Fernández, F.J. Gil, M.P. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.A. Planell, S.M. Best. "Calcium phosphate bone cements for clinical applications. I: Solution chemistry". *J Mater Sci Mater Med* 1999;10:169-176.
23. E. Fernández, F.J. Gil, M.P. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.A. Planell, S.M. Best. "Calcium phosphate bone cements for clinical applications. II: Precipitate formation during setting reactions". *J Mater Sci Mater Med* 1999;10:177-183.
24. J. Friberg, E. Fernández, S. Sarda, M. Nilsson, M.P. Ginebra, S. Martínez, J.A. Planell. "An experimental approach to the study of the rheology behaviour of synthetic bone calcium phosphate cements". *Key Engineering Materials* 2001;192-195:777-780.
25. M.P. Ginebra, M.G. Boltong, E. Fernández, J.A. Planell, F.C.M. Driessens. "Effect of various additives and temperature on some properties of an apatitic calcium phosphate cement". *J Mater Sci Mater Med* 1995;6:612-616.
26. M.P. Ginebra, E. Fernández, F.C.M. Driessens, M.G. Boltong, J. Muntasell, J. Font, J.A. Planell. "The effects of temperature on the behaviour of an apatitic calcium phosphate cement". *J Mater Sci Mater Med* 1995;6:857-860.
27. M. Böhner, U. Gbureck, J.E. Barralet. "Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment". *Biomaterials* 2005;26:6423-6429.
28. H. Oonishi. "Bioactive bone cements". In: *The Bone-Biomaterial Interface* (Ed. J.E. Davies), 1991, pp. 321-333 (University of Toronto Press, Toronto, Canada).
29. M. Böhner, *Key.Eng.Mater.* **192-195** (2001) 765.
30. K. Takegami et al., New ferromagnetic bone cement for local hyperthermia. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998, vol. 43, no2, pp. 210-214.
31. Del Real RP, Arcos D, Vallet-Regí M, Implantable magnetic glass-ceramic based on (Fe,Ca)SiO₃ solid solutions. *Chem Mater* 2002, vol. 14, no1, pp. 64-70
32. D. Poletti et. al., *Biomaterials*, 21 (2000) 1103-1114.
33. E. Fernández . "Bioactive bone cements". In : *Wiley Encyclopaedia of Biomedical Engineering* (2006) 1-10.



Páginas Web

<http://www.retsche.com/195.0.html?&L=2>

Descripción del molino utilizado y su funcionamiento

<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/magnetic/hall.html>

Trata del efecto Hall

[http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81gata_\(mineral\)](http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81gata_(mineral))

La agata mineral

http://www.familia.cl/ciencia/efecto_coriolis/coriolis2.htm

Explicación y origen de la fuerza de Coriolis

http://www.mts.com/stellent/groups/public/documents/library/dev_002046.pdf

http://www.mts.com/stellent/groups/public/documents/library/dev_002047.pdf

Descripción de la máquina de compresión

http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/1420035.html

El fosfato de calcio

http://fr.wikipedia.org/wiki/Perm%C3%A9abilit%C3%A9_magn%C3%A9tique

La permeabilidad magnética relativa

<http://es.wikipedia.org/wiki/Hist%C3%A9resis>

<http://www.ifent.org/lecciones/cap07/cap07-06.asp>

El ciclo de Histéresis

http://www.nutrivea.com/equilibre_du_ph_du_corps.htm

el pH en el cuerpo



Libros

M.A. PLONUS, *electromagnetismo aplicado* (1992).

